



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias

Tesis de Doctorado

Mastitis bovina causada por *Staphylococcus* coagulasa negativos

Cesar Celestino Bonetto

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar el título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**Mastitis bovina causada por *Staphylococcus*
coagulasa negativos**

Autor: BONETTO, Cesar Celestino

Director: Doctora Claudia G. Raspanti

Co-director: Doctora Gabriela I. Giacoboni

Lugar de trabajo: Laboratorio de Genética Microbiana Dpto. de Microbiología e Inmunología
Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río
Cuarto. Laboratorio Labvima S.H Villa María-Córdoba

Miembros del Jurado:

Doctora Mercedes Lojo
Doctora Nora Mestorino
Doctor Luis Calvhino

2014

A mi esposa e hijos por su paciencia y comprensión

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de La Plata por haberme permitido obtener mi título de Posgrado

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por haberme permitido desarrollar el trabajo de Tesis.

A la Dra. Claudia Raspanti por brindar su conocimiento y experiencia en mi formación científica e intelectual, además su valiosa predisposición y generosidad.

A la Dra. Grabiela Giacoboni por su permanente apoyo, estímulo y colaboración.

A la Dra. Nora Mestorino, Dra. Mercedes Lojo, Dr Luis Calvinho, por haber aceptado ser tribunal de esta Tesis y por sus aportes científicos a la misma.

A todos los integrantes del Laboratorio de Genética Microbiana de la UNRC por los momentos compartidos.

A la Dra. Cristina Bogni, Dra. Liliana Odierno, Dra. Claudina Vissio y Dr. Alejandro Larriestra, por su aporte en este trabajo de Tesis.

A mi familia por su inagotable acompañamiento.

A todos los integrantes del Laboratorio Labvima S.H por la colaboración en este trabajo.

Amigos y personas conocidas que me alentaron con sus consejos y estímulo.

A la Lic. Gabriela Cabrera por su colaboración en este trabajo.

A la Universidad Nacional de Villa María, por su aporte en mi formación de posgrado.

Eternamente Gracias.

PROLOGO

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein

El presente Trabajo de Tesis se desprende como una línea de investigación del grupo de la UNRC dedicado al estudio de la problemática de la mastitis bovina tanto en aspectos básicos como aplicados con estudios genéticos, epidemiológicos y de virulencia de los principales microorganismos involucrados en la mastitis bovina. *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) es un grupo bacteriano formado por varias especies que por lo general eran considerados flora oportunista de la piel y agentes patógenos menores de mastitis bovina sobre todo en comparación con los principales agentes patógenos tales como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, e incluso con frecuencia ignorados en el marco del control de la mastitis. En estos últimos años están emergiendo como potenciales bacterias responsables de infecciones intramamarias (IIM) en las explotaciones lecheras modernas, siendo frecuentemente los más aislados. Existen claras evidencias, principalmente en casos subclínicos, como también mastitis clínicas leves y subclínica de larga duración que ocasionan una reducción en la producción de leche además de un daño en los tejidos secretores. Por lo tanto, este trabajo de tesis intenta dilucidar algunos aspectos relacionados con la metodología de diagnóstico fenotípica y genotípica, los factores de virulencia que contribuyen a la patogenicidad, persistencia de las infecciones, y a la susceptibilidad de los distintos antimicrobianos, como así también los genes asociados a la formación de biofilm y los relacionados con los antibióticos

β -lactámicos. En resumen, esta tesis intenta profundizar el conocimiento del rol de los SCN dentro de las IIM, en especial la significancia clínica de cada especie, contribuyendo al desarrollo de estrategias de control y prevención de la mastitis por SCN.

CITAS BIBLIOGRAFICAS CORRESPONDIENTE A LAS PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS.

- Dieser, S., Oddi, T., Frigerio, C., Bettera, S., Bogni, C., Odierno, L., **Bonetto, C.**, Raspanti, C. Conventional identification to the species level of coagulase negative *Staphylococcus* bovine strains. 2009. Biocell. 33(2):148. ISSN: 0327-9545.
- Dieser, S., Reinoso, E., Bello, C., **Bonetto, C.**, Odierno, L., Bogni, C., Raspanti, C. Genotypic and phenotypic typing methods of coagulase negative Staphylococci isolated from bovine milk. 2009. Biocell 33 (Supl.):96. ISSN: 0327-9545.
- Dieser, S., Reinoso, E., Vissio, C., Larriestra, A., **Bonetto, C.**, Raspanti, C. Coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk: Frequency of isolation and antimicrobial resistance in Argentine dairy herds. Poster presentation. XXVI World Buiatrics Congress. 2010. Santiago de Chile. Chile.
- **Bonetto, C.**, Vissio, C., Dieser, S., Frola, I., Odierno, L., Raspanti, C. Especies Formadoras de biofilm de *Staphylococcus* coagulasa negativos aislados de leche bovina. 2da Reunión Conjunta de las Sociedades de Biología de la República Argentina. 17 al 19 de Agosto 2011. San Juan.
- **Bonetto, C.**, Pellegrino, M., Vissio, C., Richardet, M., Lasagno, M., Bogni, C., Odierno, L., Raspanti, C. Genotypic characterization of *Staphylococcus* coagulase

negative resistant to β -lactams. XIX Jornadas Científicas Sociedad de Biología de Córdoba 2013. La Falda.

-Raspanti, C., **Bonetto, C.**, Vissio, C., Reinoso, E., Dieser, S., Pellegrino, M., Bogni, C., Larriestra, A., Odierno, L. Prevalence and antibiotic susceptibility of CoNS species from bovine subclinical mastitis on dairy herds in the central region of Argentina. Enviado a publicar Abril 2014, JDR4001. Journal of Dairy Research.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|------------|
| AGRADECIMIENTOS | II |
| PROLOGO | IV |
| LISTA DE PUBLICACIONES PARCIALES | V |
| LISTA DE ABREVIATURAS | XIV |
| LISTAS DE CUADROS Y TABLAS | XVI |
| LISTA DE FIGURAS | XIX |
| RESUMEN | 1 |
| ABTRACTS | 3 |
| 1. INTRODUCCION | 5 |
| 1.1. MASTITIS BOVINA | 5 |
| 1.1.1. Generalidades | 5 |
| 1.1.2. Desarrollo de la enfermedad | 8 |
| 1.1.3. Tipos de mastitis | 13 |
| 1.1.3.1. Mastitis clínica | 13 |
| 1.1.3.2. Mastitis subclínica | 15 |
| 1.1.3.3. Mastitis crónica | 17 |
| 1.1.3.4. Mastitis inespecífica | 18 |
| 1.1.4. Agentes etiológicos bacterianos causales de mastitis | 18 |
| bovina | |
| 1.1.4.1. Microorganismos contagiosos | 18 |
| 1.1.4.2. Microorganismos ambientales | 19 |
| 1.1.4.3. Microorganismos oportunistas | 20 |

| | |
|--|----|
| 1.1.4.4. Otros microorganismos | 20 |
| 1.1.5. Impacto de la mastitis en la industria lechera | 21 |
| 1.1.6. Diagnóstico de mastitis bovina | 24 |
| 1.1.7. Control de la mastitis: medidas profilácticas | 25 |
| 1.1.8 Tratamiento de la mastitis bovina | 27 |
| 1.2. IMPORTANCIA DE LOS <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos en la mastitis bovina | 32 |
| 1.2.1. Género <i>Staphylococcus</i> | 32 |
| 1.2.2. <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos (SCN) | 38 |
| 1.2.2.1. Identificación de especies de SCN | 39 |
| 1.2.2.1.1. Métodos convencionales | 41 |
| 1.2.2.1.2. Métodos moleculares | 44 |
| 1.2.2.1.3. Comparación de métodos fenotípicos y genotípicos para la identificación a nivel de especie de SCN | 48 |
| 1.2.2.2. Factores de virulencia de SCN | 50 |
| 1.2.2.2.1. Producción de proteasas | 52 |
| 1.2.2.2.2. Producción de lipasas | 53 |
| 1.2.2.2.3. Producción de hemolisinas | 54 |
| 1.2.2.2.4. Producción de biofilm | 55 |
| 1.2.2.3. Signos clínicos y RCS en IIM por SCN | 58 |
| 1.2.2.4. Persistencia de las IIM por los SCN | 61 |
| 1.2.2.5. Factores que predisponen las IIM por SCN | 63 |
| 1.2.2.6. ¿Los SCN protegen contra las IIM por los patógenos principales? | 64 |

| | |
|--|----|
| 1.2.2.7. Significancia de las IIM por SCN | 65 |
| 1.2.2.8. Impacto de los SCN sobre la calidad de la leche | 67 |
| 1.2.2.9. Prevalencia de SCN en mastitis bovina | 67 |
| 1.2.2.10. Epidemiología de la mastitis por SCN | 69 |
| 1.2.2.10.1. Reservorios de SCN en rodeos lecheros | 69 |
| 1.2.2.10.2. Epidemiología molecular de SCN | 71 |
| 1.2.2.11. Terapia antimicrobiana de los SCN | 74 |
| 1.2.2.11.1. Resistencia a antimicrobianos en cepas de SCN | 76 |
| 2. OBJETIVOS | 80 |
| 2.1. Objetivo general | 80 |
| 2.2. Objetivos específicos | 80 |
| 3. MATERIAL Y METODOS | 82 |
| 3.1. Materiales | 82 |
| 3.1.1. Cepas bacterianas | 82 |
| 3.1.2. Medios de cultivo y drogas | 83 |
| 3.1.3. Soluciones y reactivos | 86 |
| 3.1.4. Compuestos | 87 |
| 3.1.5. Disco y placas de antibióticos comerciales | 87 |
| 3.1.6. Soluciones para la extracción de ADN cromosomal | 87 |
| 3.1.7. Compuestos y soluciones para la amplificación de ADN | 88 |
| 3.1.8. Compuestos y Enzimas de Restricción (Promega) para la digestión enzimática de los productos amplificados por PCR | 89 |
| 3.1.9. Compuestos y soluciones para electroforesis en gel de agarosa | 89 |

| | |
|--|-----|
| 3.1.10. Cebadores para la detección de los genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>bap</i> y <i>eno</i> . | 90 |
| 3.1.11. Cebadores para la detección de los genes <i>blaZ</i> y <i>mecA</i> | 90 |
| 3.1.12. Compuestos y soluciones para la Prueba de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) | 91 |
| 3.1.13. Aparatos e instrumental | 93 |
| 3.2. Métodos | 95 |
| 3.2.1. Identificación a nivel de especie de SCN por la técnica de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción del producto de amplificación por PCR del gen <i>groEL</i> (PCR-RFLP del gen <i>groEL</i>) | 95 |
| 3.2.1.1. Extracción de ADN genómico | 95 |
| 3.2.1.2. Amplificación de ADN por PCR | 95 |
| 3.2.1.3. Digestión enzimática de los productos por PCR | 96 |
| 3.2.1.4. Electroforesis en gel de agarosa | 97 |
| 3.2.1.5. Análisis de RFLP del gen <i>groEL</i> | 97 |
| 3.2.2. Identificación de especies de SCN mediante pruebas fisiológica y bioquímicas: marcha bacteriológica convencional simplificada | 98 |
| 3.2.2.1. Sensibilidad a la furazolidona | 102 |
| 3.2.2.2. Prueba de la novobiocina | 102 |
| 3.2.2.3. Producción de fosfatasa alcalina | 103 |
| 3.2.2.4. Producción de hemolisinas | 103 |
| 3.2.2.5. Producción de pigmentos | 103 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.2.6. Utilización aeróbica de xilosa | 104 |
| 3.2.2.7. Producción de ureasa | 105 |
| 3.2.2.8. Producción de acetoína (Voges- Proskauer) | 105 |
| 3.2.2.9. Prueba de DNAsa | 105 |
| 3.2.3. Detección de factores de virulencia: lipasas, sinergismo de hemólisis y proteasas | 107 |
| 3.2.3.1 Prueba de actividad de lipasas | 107 |
| 3.2.3.2. Prueba del sinergismo de hemólisis | 107 |
| 3.2.3.3. Prueba de actividad de proteasas | 108 |
| 3.2.4. Formación de biofilm en placas de micro titulación (prueba cuantitativa) | 109 |
| 3.2.5. Ensayos de PCR para la detección de los genes del operón <i>icaADBC</i> , <i>bap</i> y <i>eno</i> | 111 |
| 3.2.6. Prueba de sensibilidad a antibióticos por determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) Trek Diagnostic Systems | 113 |
| 3.2.7. Ensayos de PCR para la detección de genes asociados a la resistencia a β -lactámicos, <i>blaZ</i> y <i>mecA</i> | 114 |
| 3.2.8. Electroforesis en gel de agarosa | 115 |
| 3.2.9. Conservación de cepas | 116 |
| 4. RESULTADOS | 117 |
| 4.1. Identificación a nivel de especie de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos aislados a partir de leche bovina: PCR-RFLP del gen <i>groEL</i> | 117 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.1. Puesta a punto de la técnica de PCR-RFLP del gen <i>groEL</i> con cepas de referencia de SCN | 117 |
| 4.1.2. Frecuencia de aislamiento de especies de SCN identificadas genotípicamente por PCR-RFLP del gen <i>groEL</i> | 121 |
| 4.1.3. Comparación del método molecular PCR-RFLP del gen <i>groEL</i> con dos metodologías fenotípicas para la identificación de especies de SCN aisladas de leches bovinas | 122 |
| 4.2. Evaluación de un nuevo esquema de identificación bioquímica sencillo para especies de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos con significancia clínica en mastitis bovina | 125 |
| 4.3. Distribución de SCN en bajos, medianos y altos RCS | 128 |
| 4.4. Evaluación de la capacidad de producir factores de virulencia por diferentes especies de SCN | 130 |
| 4.4.1. Actividad lipolítica | 130 |
| 4.4.2. Actividad proteolítica | 130 |
| 4.4.3. Sinergismo de hemólisis | 131 |
| 4.5. Formación de biofilm y distribución de genes asociados a biofilm entre especies de SCN | 132 |
| 4.5.1. Perfiles genotípicos asociados a la producción de biofilm | 136 |
| 4.6. Asociación entre la producción de factores de virulencia por diferentes especies de SCN y el grado de inflamación de la glándula mamaria | 137 |
| 4.7. Susceptibilidad antimicrobiana | 139 |

| | |
|---|-----|
| 4.7.1. Determinación de los perfiles fenotípicos de resistencia a antibióticos en especies de SCN | 140 |
| 4.7.2. Detección de los genes de resistencia a β -lactámicos <i>blaZ</i> y <i>mecA</i> , en cepas de SCN | 141 |
| 4.7.2.1. Detección por PCR de los genes <i>blaZ</i> y <i>mecA</i> | 142 |
| 4.7.2.2. Perfiles de resistencia genética a β -lactámicos | 143 |
| 5. DISCUSION Y CONCLUSION | 145 |
| 5.1. Identificación molecular de especies de SCN | 145 |
| 5.2. Identificación fenotípica de especies de SCN por una marcha bacteriológica rápida y sencilla | 148 |
| 5.3. Distribución de SCN en bajos, medianos y altos RCS | 148 |
| 5.4. Factores de virulencia de SCN: lipasas, proteasas y sinergismo de hemólisis | 150 |
| 5.5. Biofilm en las especies de SCN: formación y genes asociados | 152 |
| 5.6. Asociación entre la producción de factores de virulencia por diferentes especies de SCN y el grado de inflamación de la glándula mamaria | 155 |
| 5.7. Susceptibilidad antimicrobiana | 156 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 163 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| ADN | Acido desexorribonucleico |
| AMH | Agar Mueller Hinton |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| AFLP | Polimorfismo de Longitud de fragmentos amplificados |
| BHIA | Agar cerebro-corazón |
| BAP | Proteína asociada a biofilm |
| cél/ml | Células por mililitro |
| CMT | California mastitis test |
| CIM | Concentración Inhibitoria Minina |
| DO | Densidad óptica |
| MLST | Tipificación de secuencias múltiples locus |
| IIM | Infecciones intramamarias |
| PCR-RFLP | Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción de secuencias de ADN amplificadas por PCR |
| PCR | Reacción en la cadena de la polimerasa |
| PFGE | Electroforesis de campo pulsado |
| RCS | Recuento de Células Somáticas |
| PIA | Polisacárido de adhesión intercelular |
| RBT | Recuento bacteriano total |
| SCN | <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos |
| SCP | <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivos |

| | |
|---------------|--|
| SE | Enterotoxinas estafilocócicas |
| SH | Sinergismos de hemolisis |
| TSA | Agar tripticasa soya |
| TSB | Caldo Tripticasa Soya |
| UFC/ml | Unidades formadoras de colonias por mililitro |

LISTA DE CUADROS Y TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Cuadro 1. Asociación de SCN, hospederos y principales enfermedades | 39 |
| Cuadro 2. Aislamientos de SCN de reservorios extramamarios en rodeos lecheros | 74 |
| Tabla 1. Tipos de células en la leche | 13 |
| Tabla 2. Diagnóstico de un cuarto según el conteo de células somáticas | 13 |
| Tabla 3. Especies del género <i>Staphylococcus</i> | 36 |
| Tabla 4. Subespecies del género <i>Staphylococcus</i> | 36 |
| Tabla.5. Enzimas de restricción utilizadas para la obtención de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen <i>groEL</i> | 89 |
| Tabla 6. Cebadores y cepas control para la amplificación por PCR de genes asociados a biofilm | 90 |
| Tabla 7. Genes blanco, cebadores, programas de PCR y tamaño de amplicones | 91 |
| Tabla 8. Relación entre la concentración de cloruro de bario/ácido sulfúrico y el título de una suspensión bacteriana | 92 |
| Tabla 9. Características culturales y bioquímicas de <i>Staphylococcus chromogenes</i> | 99 |
| Tabla 10. Características culturales y bioquímicas de <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 99 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 11. Características culturales y bioquímicas de <i>Staphylococcus xylosus</i> | 99 |
| Tabla 12. Características culturales y bioquímicas de <i>Staphylococcus warneri</i> | 100 |
| Tabla 13. Características culturales y bioquímicas de <i>Staphylococcus simulans</i> | 100 |
| Tabla 14. Características culturales y bioquímicas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 100 |
| Tabla 15. Características culturales y bioquímicas de <i>Staphylococcus capitis</i> | 101 |
| Tabla 16. Características culturales y bioquímicas de <i>Staphylococcus hyicus</i> | 101 |
| Tabla 17. Mezcla de reacción y programa de PCR para la amplificación de los genes <i>icaA</i> , <i>icaB</i> e <i>icaD</i> | 111 |
| Tabla 18. Mezcla de reacción y programa de PCR para la amplificación del gen <i>bap</i> | 112 |
| Tabla 19. Mezcla de reacción y programa de PCR para la amplificación del gen <i>eno</i> | 112 |
| Tabla 20. Mezcla de reacción y programa de PCR para la amplificación de los genes <i>blaZ</i> y <i>mecA</i> | 115 |
| Tabla 21. Identificación de especies de 302 SCN aislados a partir de leche bovina usando PCT-RFLP del gen <i>groEL</i> y el número de aislamientos identificados correctamente usando una marcha bacteriológica convencional y <i>Staph-Zym</i> TM | 124 |

| | |
|--|------------|
| Tabla 22. Identificación de especies de SCN por el esquema sencillo de pruebas metabólicas comparada a la del método genotípico de referencia | 127 |
| Tabla 23. Producción de factores de virulencia a partir de aislamientos de especies de SCN obtenidos de leches con niveles bajos y altos de RCS | 131 |
| Tabla 24. Distribución de la producción de biofilm y de genes asociados a biofilm entre especies de SCN | 133 |
| Tabla 25. Perfiles genotípicos asociados a la producción de biofilm | 136 |
| Tabla 26. Producción de biofilm a partir de aislamientos de especies de SCN obtenidos de leches con niveles bajos y altos de RCS | 138 |
| Tabla 27. Patrón de resistencia a antimicrobianos y Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para 302 SCN aislados a partir de muestras de leche bovina | 139 |
| Tabla 28. Perfiles de resistencia fenotípica de SCN obtenidos a partir de muestras de leche bovina | 141 |
| Tabla 29. Perfil fenotípico de resistencia asociado a la presencia de genes de resistencia a β-lactámicos para especies de SCN | 144 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Interacción de los factores que participan en la transmisión de la mastitis: vaca, medio ambiente y microorganismos | 6 |
| Figura 2. Tres de las principales rutas de transmisión bacteriana durante el ordeño | 8 |
| Figura 3. Desarrollo de la mastitis y de la defensa de la vaca contra la infección | 11 |
| Figura 4. Efecto de un agente patógeno y de su instalación en la glándula mamaria del animal | 12 |
| Figura 5. Mastitis Clínica subaguda | 14 |
| Figura 6. Mastitis Clínica aguda | 14 |
| Figura 7. Mastitis Subclínica | 17 |
| Figura 8. Mastitis Crónica | 17 |
| Figura 9. Morfología y tinción de Gram del género <i>Staphylococcus</i> | 35 |
| Figura 10. Colonias de <i>Staphylococcus</i> sp. | 35 |
| Figura 11. <i>Staphylococcus aureus</i> | 37 |
| Figura 12. Tubos correspondientes a los diferentes patrones de la escala de McFarland | 92 |
| Figura 13. Antimicrobianos incluidos en el sistema comercial Trek Diagnostic Systems | 93 |
| Figura 14. a) Prueba de la Furazolidona (a1 resistente - a2 sensible) y Novobiocina (a1 sensible – a2 sensible), b) Prueba de la Furazolidona | |

| | |
|---|-----|
| (b1 sensible – b2 sensible) y Novobiocina (b1 sensible – b2 resistente) c) Actividad hemolítica, d) Producción de pigmento, e) Producción de la fosfatasa | 104 |
| Figura 15. a) Prueba de la Utilización de Azúcares, b) Prueba de la Urea c) Prueba de la Acetoína | 106 |
| Figura 16. Prueba de DNasa | 106 |
| Figura 17. Prueba de lipasa en medio Baird-Parker suplementado con yema de huevo | 107 |
| Figura 18. Prueba de actividad del sinergismos de hemolisis | 108 |
| Figura 19. Prueba de proteasa | 108 |
| Figura 20. Placa de micro titulación de biofilm | 110 |
| Figura 21. Policubetas (Sin proliferación = sensible; Proliferación = Resistente) | 114 |
| Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR del gen <i>groEL</i> de 550-bp, a partir de cepas de referencia de <i>Staphylococcus spp.</i> utilizando los cebadores H279A y H280A. M: marcador de peso molecular de ADN 100 pb (Promega) | 118 |
| Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 3,5% de los fragmentos generados por la digestión con <i>AluI</i> de los productos de amplificación por PCR a partir de <i>Staphylococcus spp.</i> M: marcador de peso molecular de ADN 100 pb (Promega) | 119 |
| Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 3,5% de los fragmentos generados por la digestión con <i>AluI</i> y <i>HindIII/PvuII</i> , a | |

| | |
|--|-----|
| partir de los productos de amplificación por PCR del gen <i>groEL</i> . <i>S. chromogenes</i> , <i>S. capitis</i> y <i>S. hyicus</i> . M: marcador de peso molecular de ADN 100 pb (Promega) | 120 |
| Figura 25. Frecuencia relativa de especies de SCN aisladas de 51 tambos de la cuenca lechera de Villa María, identificados por PCR- RFLP del gen <i>groEL</i> | 122 |
| Figura 26. Esquema de identificación presuntiva de especies de SCN | 126 |
| Figura 27. Porcentaje de aislamientos puros a SCN en relación al RCS | 128 |
| Figura 28. Aislamiento de diferentes especies de SCN asociados a RCS. Ref: Sc: <i>S. capitis</i> , Sx: <i>S. xylosus</i> , Se: <i>S. epidermidis</i> , Sh: <i>S.</i> <i>haemolyticus</i> , Sw: <i>S. warneri</i> , Sch: <i>S. chromogenes</i> , Ss: <i>S.</i> <i>simulans</i> , Shy: <i>S. hyicus</i> | 129 |
| Figure 29. Habilidad (débil ó fuerte) de formar biofilm para las especies dominantes de SCN [<i>Staphylococcus chromogenes</i> (n = 64), <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n = 52), <i>Staphylococcus xylosus</i> (n = 16), <i>Staphylococcus warneri</i> (n = 9)] | 134 |
| Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa del amplicón de 517pb del gen <i>blaZ</i> para las cepas de <i>S. chromogenes</i> y <i>S. haemolyticus</i> | 142 |
| Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa del amplicón de 533pb del gen <i>mecA</i> para las cepas de <i>S. chromogenes</i> y <i>S. haemolyticus</i> | 143 |

MASTITIS BOVINA CAUSADA POR *STAPHYLOCOCCUS* coagulasa negativos

Palabras clave: mastitis bovina, especies de SCN, factores de virulencia, biofilm, RFLP-PCR del gen *groEL*, susceptibilidad antimicrobiana

RESUMEN

Con el fin de determinar la frecuencia de aislamiento de especies de 302 SCN obtenidos a partir de muestras de leche bovina provenientes de tambos ubicados en la cuenca lechera de Villa María, Córdoba, se procedió a la identificación genotípica de los aislados por análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de la secuencia parcial del gen *groEl* amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Staphylococcus chromogenes* y *Staphylococcus haemolyticus* fueron las especies aisladas con mayor frecuencia, 42% y 34%, respectivamente. Ante la inquietud de poder utilizar un método menos costoso y sin requerimiento de equipamiento y personal calificado se logró diseñar un esquema simplificado de pruebas fisiológicas y bioquímicas de fácil implementación en laboratorios de diagnóstico veterinario. La elevada prevalencia encontrada en este estudio para algunas especies, podría ser atribuida a la capacidad de las mismas para adaptarse a la glándula mamaria o a diferentes factores de los rodeos.

Con el objetivo de evaluar la capacidad de producir factores de virulencia por las diferentes especies de SCN, se investigó la actividad lipolítica, proteolítica y de sinergismo de hemólisis de las cepas en estudio en placas con medios con los sustratos específicos. Si bien el porcentaje de cepas productoras fue considerable, 41%, 54,3% y 72,3%, respectivamente, no fue posible asociar un factor en particular

con el grado de inflamación de la glándula mamaria. Al evaluar la formación de biofilm en placas de microtitulación por tinción con cristal violeta, la habilidad fue diferente entre las especies de SCN, donde el mayor porcentaje de cepas fuertemente productoras de biofilm correspondió a la especie *S. xylosus*. Cuando se investigó la distribución de genes asociados a biofilm, el gen *eno* fue el más comúnmente detectado, sugiriendo una potencial participación de la proteína de unión a laminina en la estabilidad estructural del biofilm.

Con el objetivo de analizar la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas en estudio a cinco antibióticos utilizados de rutina en el tratamiento de la mastitis en vacas lecheras se utilizó el método de microdilución en caldo (CIM). En general los porcentajes de resistencia a antimicrobianos entre los SCN analizados fue alta, el valor más elevado se observó para penicilina, lo que indica que la resistencia mediada por β -lactamasa se difunde ampliamente entre los aislados, lo que obliga a un control en el uso indiscriminado de estos antimicrobianos. Además la presencia de los genes que codifican para β -lactamasa y proteínas de unión a penicilina alteradas, *blaZ* y *mecA*, en asociación con la resistencia fenotípica a β -lactámicos, sugiere que los SCN pueden servir como reservorios importantes de genes de resistencia que podrían ser transferidos a otros estafilococos incluyendo especies más virulentas como *S. aureus*, de allí la importancia de una correcta identificación y caracterización de los aislamientos de SCN obtenidos en establecimientos lecheros, para ayudar a definir el tratamiento y las decisiones de control sanitario sobre la mastitis bovina a SCN.

BOVINE MASTITIS CAUSED BY COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI

Keywords: bovine mastitis, CNS species, virulence factors, biofilm, *groEL* gene RFLP-PCR, antimicrobial susceptibility

ABSTRACT

In order to determine the frequency of isolation of CNS species from 302 isolates obtained from bovine milk samples from herds located in the dairy basin of Villa María, Córdoba, we proceeded to the genotyping identification of isolates by polymorphism length restriction fragments (RFLP) of the partial sequence of the *groEL* gene amplified by chain reaction (PCR). *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus haemolyticus* were the species most frequently isolated, 42% and 34%, respectively. For to use a less expensive procedure and without requiring equipment and qualified personal in this study was designed a simplified schematic of physiological and biochemical tests easily implemented in veterinary diagnostic laboratories. The high prevalence found in this study for some species, could be attributed to the ability of each species to adapt to the mammary gland or to different herd factors.

With the objective of evaluating the ability to produce virulence factors by CNS species were investigated the lipolytic and proteolytic activity and synergism hemolysis in plates with specific substrates. Even though the percentage of producer strains of these virulence factors was considerable, 41%, 54.3% and 72.3%, respectively, it was not possible to associate a particular factor with the degree of inflammation of the mammary gland. In assessing biofilm formation in microtiter

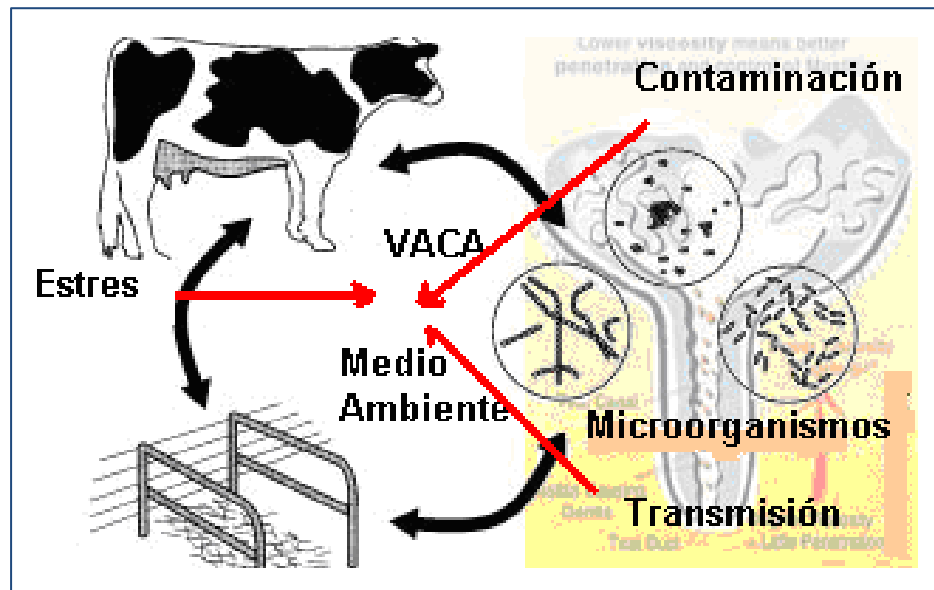
plates by staining with crystal violet, the ability was different between species CNS, *S. xylosus* was the species with the strongest ability to form biofilm. When was investigated the distribution of biofilm associated genes, the gene *eno* was the most commonly detected, suggesting a possible involvement of the laminin binding protein in the structural stability of biofilm. In order to analyze the antimicrobial susceptibility of the strains under study to five routine antibiotics used in the treatment of mastitis in dairy cows was used the broth microdilution method (MIC). Overall, rates of antimicrobial resistance among analyzed CNS was high, the highest value was observed for penicillin, indicating that the resistance mediated by β -lactamase is widely distributed among isolates, us requiring a control on the indiscriminate use of these antimicrobials. Moreover, the presence of genes encoding β -lactamase and penicillin-binding proteins altered, *blaZ* and *mecA*, in association with phenotypic resistance to β -lactams, suggests that CNS could serve as important reservoirs of resistance genes that could be transferred to other species including most virulent staphylococci such as *S. aureus*, hence the importance of correct identification and characterization of isolates of CNS in dairy farms, to help define the disease treatment and control decisions of CNS mastitis.

1. INTRODUCCION

1.1. MASTITIS BOVINA

1.1.1. Generalidades

El término mastitis deriva de las palabras griegas mastos (mama) e itis (inflamación). La mastitis, como su nombre lo indica, constituye una reacción inflamatoria de la glándula mamaria que puede ser ocasionada por microorganismos patógenos transmisibles, o por diferentes agentes como lesiones traumáticas, disturbios secretorios de origen metabólico-nutricional, situaciones de estrés, cambios fisiológicos asociados con una terminación temprana de la lactancia y, menos frecuente, por alergia y neoplasmas [Philpot y Nickerson, 1993; Ma y col., 1999; National Mastitis Council, 2004]. Debido a que el 80% de los casos de mastitis son ocasionados por la invasión de microorganismos patógenos, la virulencia del microorganismo involucrado es muy importante en el establecimiento de la enfermedad, como también la susceptibilidad del animal a las infecciones, la cual está determinada por la interacción de varios factores. Por esto se dice que es una enfermedad multifactorial [Hans Andresen, 2001], (Figura 1).



<http://www.pakissan.com/english/allabout/livestock/mastitis.monster.threat.to.dairy.industry.shtml>

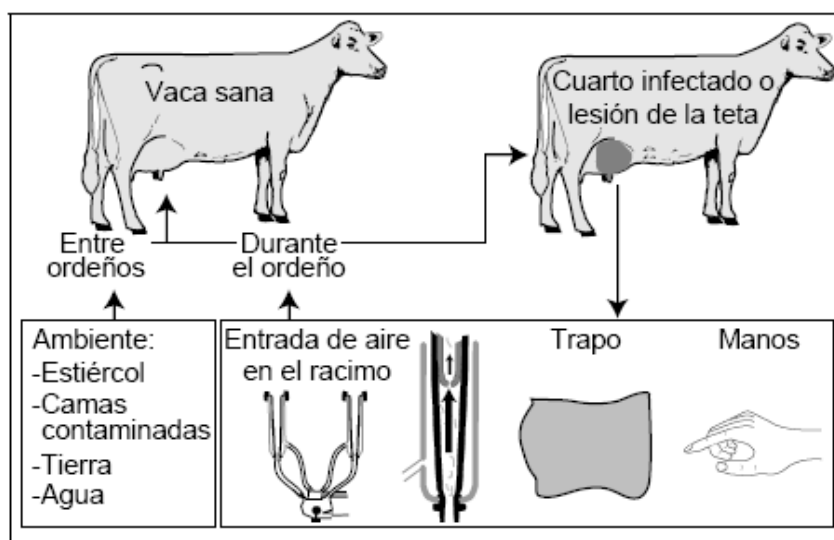
Figura 1. Interacción de los factores que participan en la transmisión de la mastitis: vaca, medio ambiente y microorganismos.

- Factores vinculados al animal, donde la mayor ó menor susceptibilidad a la mastitis está relacionada con :
 - ✓ Edad
 - ✓ Raza
 - ✓ Sexo
 - ✓ Estatus inmunitario
 - ✓ Nivel de producción
 - ✓ Conformación de la glándula mamaria (Factores genéticos)
 - ✓ Estado de lactación (primíparas, multíparas)
- Factores vinculados al medio ambiente, determinantes del mayor ó menor número de casos de mastitis, el cual depende de:

- ✓ Manejo del medio ambiente
 - Minimizar estrés
 - Minimizar exposición
- ✓ Frecuencia de ordeño
- ✓ Clima
- ✓ Nutrición
- ✓ Agrupamiento
- ✓ Instalaciones

Debemos aclarar que aquí el hombre juega un papel decisivo.

- Factores vinculados a los patógenos que pueden ser contagiosos, y así ser transmitidos fácilmente de la ubre de una vaca a la otra, especialmente durante el ordeño, o ambientales estando presentes en el medio en el que la vaca se encuentra o en su superficie corporal (Figura 2). Muy pocas bacterias son necesarias para entrar al canal del pezón y establecer una infección dentro de la glándula mamaria. Una vez que los organismos se encuentran presentes en la leche, son transmitidos fácilmente a otros cuartos de la misma vaca u otras vacas por medio de las manos del ordeñador, pezoneras y otras partes del equipo, [Tessi y col., 1981; López Meza y col., 2006].



http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/enfermedades/GA000009en.htm

Figura 2. Tres de las principales rutas de transmisión bacteriana durante el ordeño.

Por lo tanto la prevención debe enfocarse en detener la invasión de la ubre por organismos y en prevenir su diseminación de una vaca a otra. La limpieza general de las vacas y su alojamiento, como también buenos procedimientos de manejo (especialmente ordeño) son formas efectivas de controlar la propagación de la mastitis.

1.1.2. Desarrollo de la enfermedad

El desarrollo de la mastitis infecciosa comienza cuando los microorganismos penetran el canal del pezón y se multiplican en la glándula mamaria. La abertura (esfínter) del pezón representa la primera línea de defensa contra cualquier infección (Figura 3-1). El interior del canal del pezón está compuesto por un tejido musculoso que sirve como "válvula". La función de esta válvula es mantener el canal del pezón cerrado. Así se previene el flujo de la leche hacia el exterior y la entrada de bacterias hacia el interior de la ubre. Las células que componen el interior del canal del pezón

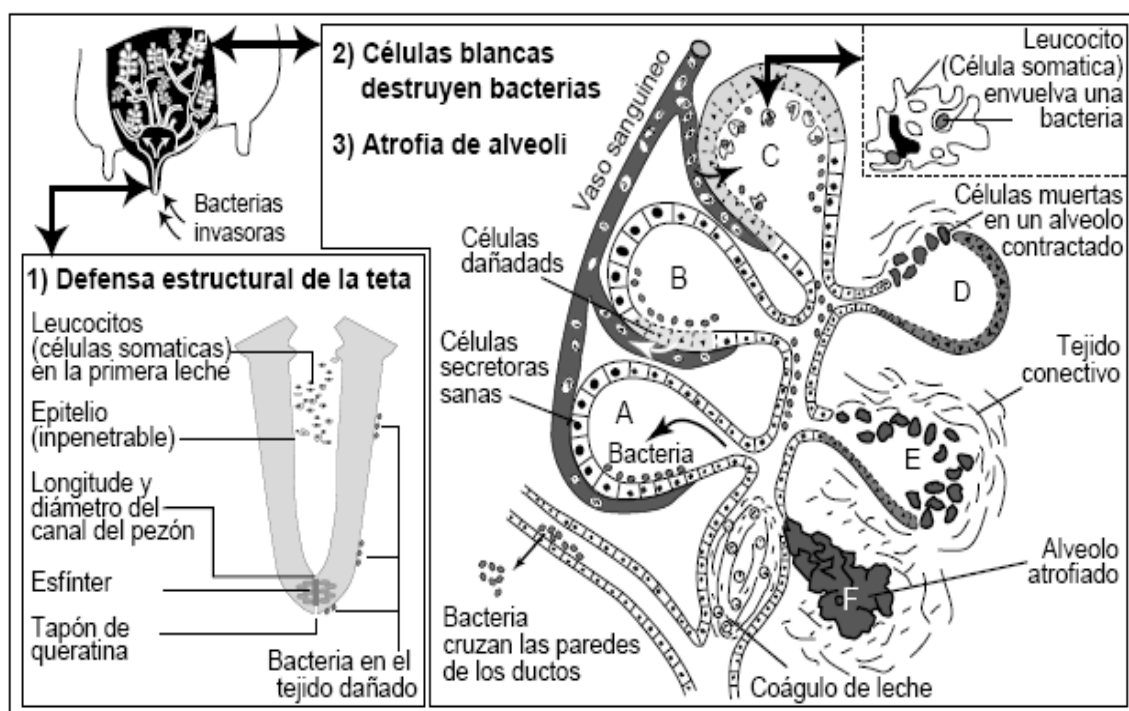
producen una sustancia llamada "queratina", compuesta por un material fibroso proteico y ácidos grasos que en conjunto poseen un fuerte poder antibacteriano, por lo que es una barrera efectiva contra la introducción de bacterias en la ubre. Durante el ordeño, las bacterias pueden estar presentes cerca/o en el esfínter del pezón, debido a su presencia en el lodo, tierra y/o estiércol. La colonización bacteriana también puede ocurrir si la piel del pezón tiene alguna lesión, si la superficie de las pezoneras o mangueras de conducción de leche están sucias, y principalmente si el procedimiento de preparación pre-ordeño no es lo suficientemente sanitario e higiénico.

Las bacterias pueden enfrentarse con leucocitos (células blancas de la leche) presentes naturalmente en bajas cantidades en la leche. Estas células son la segunda barrera de defensa debido a que su rol es destruir o neutralizar a las bacterias invasoras para que así el tejido mamario en la ubre pueda reconstituirse y eventualmente retorne a su estado productivo normal, (Figura 3-2). De acuerdo a la gravedad de las lesiones, es la recuperación de la funcionalidad de la misma. La magnitud con la cual se desarrolla una inflamación en la ubre está influenciada por el tipo de bacteria, los días en lactancia, la edad, la genética y el estado nutricional de la vaca [Harmon, 1994].

Durante este proceso, tanto las bacterias como los leucocitos liberan sustancias que atraen a más leucocitos desde el torrente circulatorio, los cuales pueden fácilmente atravesar el tejido mamario y llegar hacia los conductos lactíferos de la ubre donde se acumula la leche, la cual ya contiene células que provienen de la descamación del epitelio mamario.

Si la segunda línea de defensa logra combatir la infección, el recuento de células somáticas (RCS) se mantiene relativamente alto hasta el momento en que el tejido mamario este completamente sano. Si las bacterias no son totalmente destruidas, pueden continuar multiplicándose y comenzar a invadir los pequeños conductos y áreas alveolares (Figura 3-2-A). Las células secretoras de leche que son dañadas por las toxinas, liberan sustancias irritantes que conducen a un incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos (Figura 3-2-B). Los leucocitos adicionales se mueven al lugar de la infección y penetran el tejido alveolar en gran medida, moviéndose entre el tejido secretor de leche dañado (Figura 3-2-C) conjuntamente con fluidos, minerales y factores de coagulación. Además la leche coagulada puede cerrar los vasos lactíferos menores y, en efecto, aislar las regiones infectadas [Cruz Alamilla, 2007].

El daño del tejido mamario y la obstaculización de los conductos de la ubre pueden llegar a causar la formación de cicatrices en algunos casos. Esto puede resultar en la pérdida permanente de la funcionalidad del tejido afectado y de su habilidad para producir leche, [Harmon, 1994]. La destrucción del tejido secretor de leche es, en efecto, la tercera barrera de defensa de la vaca para mantener a la infección bajo control (Figura 3-3).



http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/enfermedades/GA000009en.htm

Figura 3. Desarrollo de la mastitis y de la defensa de la vaca contra la infección.

Algunas veces los microorganismos son eliminados rápidamente y la infección se resuelve. En este caso, los conductos tapados se abren y la composición y producción de leche retorna a la normalidad en varios días. Aún así, a medida que la infección persiste y los conductos se mantienen tapados, la leche encerrada hace que las células secretoras pasen a una etapa de descanso (sin producir) y el alvéolo comienza a reducir su tamaño (Figura 3-3-D). Las sustancias liberadas por los leucocitos conducen a una destrucción completa de las estructuras alveolares, que son reemplazadas por tejido conectivo y cicatriza (Figura 3-3-E y 3-3-F). La destrucción del tejido secretor de leche es, en efecto, la tercera línea de defensa de la vaca para mantener a la infección bajo control. Así, a medida que la enfermedad progresa el número de células somáticas en la leche se eleva y se asocia con una reducción (permanente) en la producción de leche.

En un principio se denominó a las células presentes en la leche “Células Somáticas” por considerarse que provenían del soma o cuerpo, posteriormente se reconoció que los principales tipos celulares en una glándula mamaria son leucocitos provenientes de la sangre, más del 85% de las células de la leche de un cuarto infectado son leucocitos (macrófagos, linfocitos, neutrófilos), mientras que el resto son células de descamación que provienen de los tejidos mamarios (Figura 4), sin embargo el uso del término “Células Somáticas”, se generalizó para caracterizar a las células presente en la leche. Esta migración de los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y fagocitos durante el proceso infeccioso da lugar al incremento en el recuento de células somáticas (RCS) en la leche y también puede causar el daño del tejido mamario [Harmon 1996; Suriyasathapom y col., 2000].

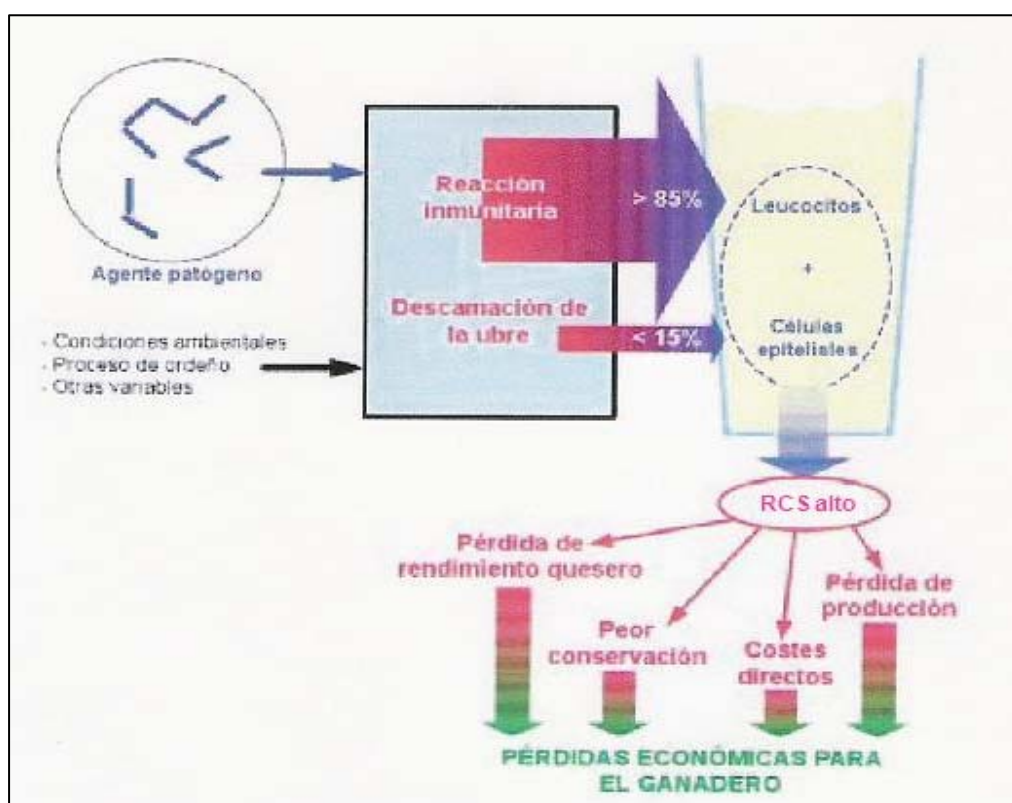


Figura 4. Efecto de un agente patógeno y de su instalación en la glándula mamaria del animal.

El RCS, que comúnmente se expresa en número de células por mililitro [Philpot, 2001; Bedolla y col., 2007], es una herramienta muy valiosa en la toma de decisiones para la implementación de medidas de prevención y control de la mastitis [Gill y col., 1990; Carrión, 2001; Wolter y Kloppert, 2004] ya que en la leche de una glándula mamaria sana normalmente este parámetro se encuentra en niveles bajos (RCS ≤ 200.000 cél/ml) [Wolter y Kloppert, 2004] y en las proporciones características para cada tipo de células, [Östensson y col., 1998; Wolter y Kloppert, 2004], (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Tipos de células en la leche.

| Tipo | Porcentaje |
|--------------------------|------------|
| Macrófagos | 60% |
| Linfocitos | 25% |
| Polimorfonucleares (PMN) | 15% |

Fuente: Östensson y col., 1998.

Tabla 2. Diagnóstico de un cuarto según el conteo de células somáticas.

| Células/ml de leche | Estado de la ubre |
|----------------------|--|
| Hasta 100.000 | Sana, leche normal |
| De 100.000 a 200.000 | Sospechoso, nivel fisiológico superior |
| Más de 200.000 | Mastitis, leche anormal |

Fuente: Wolter y Kloppert, 2004.

1.1.3. Tipos de mastitis

1.1.3.1. Mastitis clínica

En la infección clínica se observa una reacción inflamatoria bien definida de la ubre con síntomas característicos locales (enrojecimiento, alta temperatura, sensibilidad y edema subcutáneo) y cambios en las propiedades físico-químicas y

organolépticas de la leche [Philpot y Nickerson, 1993], (Figuras 5 y 6). A nivel local puede seguir un curso rápido y progresivo de endurecimiento, sensibilidad, disminución de la circulación sanguínea y eventual destrucción tisular de los cuartos infectados [McDonald, 1984].

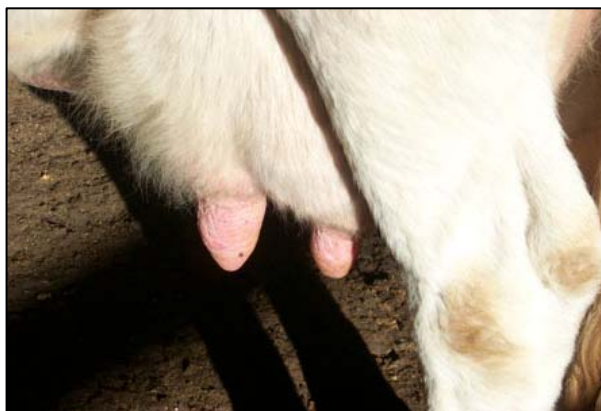


Figura 5. Mastitis Clínica subaguda.

En los casos severos, se observan signos sistémicos como temperatura corporal elevada, anorexia, toxemia, depresión y postración, los cuales pueden culminar en bacteriemia, septicemia y muerte del animal [McDonald, 1984; Philpot y Nickerson, 1993; Leigh, 2003].



Figura 6. Mastitis Clínica aguda.

Los signos clínicos de la enfermedad son una expresión de los mecanismos de defensa del huésped con el fin de neutralizar o destruir el agente causal, reparar los tejidos y restituir la función normal [Jain, 1979].

El diagnóstico se realiza a través de la palpación de la glándula mamaria y del análisis del aspecto macroscópico de la leche [Philpot y Nickerson, 1993].

1.1.3.2. Mastitis subclínica

En la infección subclínica, no se observan signos clínicos evidentes en el animal (Figura 7) y la apariencia normal de la leche favorece la posible transmisión del agente infeccioso a animales sanos del rodeo. De este modo, la glándula actúa como un “reservorio” de agentes causantes de la enfermedad contribuyendo a pérdidas extremadamente significativas en la producción y calidad de la leche, de allí que la detección de casos subclínicos resulta de fundamental importancia [Philpot y Nickerson, 1993]. El tipo subclínico es 15 a 40 veces más frecuente que la manifestación clínica, usualmente la precede y es de larga duración.

La mastitis subclínica, se define como la mastitis que no puede ser diagnosticada por el examen clínico, sino que es necesaria la detección de los productos inflamatorios en la leche. Así, es posible efectuar el diagnóstico de la enfermedad mediante exámenes indirectos como la prueba de California para mastitis (CMT) ó a través del recuento bacteriano total (RBT) [Sears y col., 1993] y RCS [Philpot y Nickerson, 1993; Leigh, 2003].

El RCS suele combinarse con el examen bacteriológico de la leche para obtener un diagnóstico etiológico. Los gastos causados por mastitis subclínica se

deben principalmente a la pérdida de la producción de leche, de pago reducido causados por una menor calidad de la leche, y los costos de sacrificio y la sustitución de las vacas [Sandgren y col., 2008].

El impacto económico directo de valores elevados de RCS difiere considerablemente entre países, y depende de la violación de límites para leche de calidad reducida o de premios pagados por leche de alta calidad. Los requerimientos de calidad para leche cruda en nuestro país son elevados y el precio de la leche de tanque está ligado al RCS como ocurre en la Unión Europea. En Argentina según la información que brinda el Centro de Industrias Lecheras (CIL), entidad que a través de sus empresas recibe el 60% de la leche del país, el promedio de células somáticas de los tambos nacionales varía entre las 340.000 y las 380.000 a lo largo del año. Si bien estos datos son válidos, puede que en realidad en esas empresas se puedan encontrar 400.000 células somáticas promedio. Con esto, estaríamos muy por encima de otros países como Suiza (110.000) o Suecia, Noruega y Dinamarca (con menos de 200.000), [Aba, 2006]. Independientemente de estos valores la industria espera y bonifica las leches con menos de 250.000 cél/mL porque obtiene mejores rendimientos industriales, mejor sabor de los productos y mayor duración en el mostrador [National Mastitis Council 2004].



Figura 7. Mastitis Subclínica.

1.1.3.3. Mastitis crónica

La forma crónica puede comenzar como mastitis clínica o subclínica y puede ser detectada con signos intermitentes de mastitis clínica. Tiene usualmente un desarrollo progresivo de tejido cicatrizante y muestra un cambio en el tamaño y forma de la glándula afectada (Figura 8), acompañado de pérdidas o reducciones en la producción de leche. El tiempo entre los episodios de mastitis clínica y subclínica puede variar marcadamente, dependiendo de los microorganismos infecciosos, del estrés del animal y otros factores [Philpot y Nickerson, 1993].



Figura 8. Mastitis Crónica.

1.1.3.4. Mastitis inespecífica

Conocida también como mastitis aséptica, se caracteriza por la ausencia de aislamiento de microorganismos a partir de las muestras de leche y pueden ser casos tanto clínicos como subclínicos [Philpot y Nickerson, 1993].

1.1.4. Agentes etiológicos bacterianos causales de mastitis bovina

Si bien existen causas no infecciosas que pueden desencadenar los mecanismos que caracterizan a la respuesta inflamatoria, el 80% de las mastitis son ocasionadas por agentes infecciosos [Watts, 1988].

Una gran variedad de microorganismos han sido involucrados como agentes causales de mastitis bovina. De acuerdo a su hábitat, interacción con el pezón y canal y patogenicidad, los microorganismos pueden ser clasificados como microorganismos contagiosos, microorganismos ambientales, oportunistas y otros microorganismos [Watts, 1988; Philpot y Nickerson, 1993].

1.1.4.1. Microorganismos contagiosos

Las fuentes de estos microorganismos son las ubres infectadas de las vacas, contribuyendo a la transmisión desde los cuartos infectados a los no infectados principalmente durante el ordeño [Philpot y Nickerson, 1993].

Si bien las especies más frecuentemente aisladas dentro de este grupo incluyen a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, también se señala a

Mycoplasma bovis, *Corynebacterium bovis* y *Streptococcus dysgalactiae* como agentes causales de mastitis bovina [Philpot y Nickerson, 1993].

1.1.4.2. Microorganismos ambientales

El principal reservorio de estos microorganismos se encuentra en los alrededores del establo, incluyendo la materia fecal, el suelo, el agua, alimentos ensilados, corrales y material vegetal [Philpot y Nickerson, 1993]. Su amplia distribución en el medio ambiente y sus posibilidades de alcanzar el tejido glandular aumenta en condiciones de mala higiene, con ordeños realizados en ubres húmedas, uso de esponjas sucias y con camas inadecuadas [Giraud y Busso, 1980].

Los principales microorganismos reconocidos dentro de este grupo son *Streptococcus uberis*, *Streptococcus equinus*, especies del género *Enterococcus* y enterobacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, y especies de *Citrobacter*, *Serratia* y *Proteus* [Philpot y Nickerson, 1993]. *Streptococcus dysgalactiae* ha sido descrito como una especie de naturaleza tanto infecciosa como ambiental.

Dentro de los patógenos no comunes del medio ambiente, podemos mencionar a *Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, levaduras, *Nocardia asteroides*, y el alga incolora *Prototheca* sp., entre otros [Hans Andresen, 2001].

1.1.4.3. Microorganismos oportunistas

Los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) se encuentran normalmente colonizando la piel sana de los pezones y en las manos de los ordeñadores, y por esto se encuentran en una posición “oportunistas” para colonizar el canal del pezón. La incidencia de infecciones por SCN es alta durante el periodo seco, cuando la piel del pezón no está expuesta a los desinfectantes, por esto el porcentaje de cuartos afectados es alto en el parto y mayor en vaquillonas de primer parto. En la actualidad, SCN son la principal causa de mastitis subclínica en la mayoría de los rodeos lecheros con un adecuado manejo higiénico-sanitario que han controlado la mastitis contagiosa.

Varios estudios han sugerido que los SCN se consideren patógenos emergentes causantes de mastitis [Davidson y col., 1992; Pyörälä y Taponen de 2009; Paradis y col., 2010]

1.1.4.4. Otros microorganismos

Una gran variedad de microorganismos, oportunistas o no, son hallados menos frecuentemente e incluyen a los géneros *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Nocardia*, *Bacillus* y *Pasteurella*. Las infecciones causadas por algunos de estos microorganismos casi siempre son debidas a los inadecuados procedimientos de manejo, especialmente cuando se desarrollan las condiciones que pueden incrementar la exposición a ellos [Philpot y Nickerson, 1993].

Otros tipos de microorganismos menos comunes como levaduras del género *Candida* y otros hongos, también pueden producir infecciones [Philpot y Nickerson, 1993].

1.1.5. Impacto de la mastitis en la industria lechera

La mastitis bovina afecta la producción y la calidad de la leche siendo una de las causas más significante de pérdidas económicas para el productor y para la industria lechera a nivel mundial [Sbodio y col., 1981; Ratafia, 1987; Philpot y Nickerson, 1993; Ma y col., 1999; Sordelli y col., 2000; Bradley, 2002; 2003; Bradley y col., 2003; López Meza y col., 2006; Aba, 2006]. Se estima que un tercio de todas las vacas lecheras están afectadas en uno o más cuartos [Philpot, 1984]. Es así que económicamente, la mastitis afecta al productor lechero a través de costos que pueden ser clasificados en directos, como la leche rechazada durante el tratamiento con antibióticos con el fin de evitar la contaminación de la totalidad de la misma y el factible daño a la salud pública, los gastos de servicio médico veterinario y los medicamentos; e indirectos, donde se destacan la reducción del rendimiento de leche durante la lactancia, alteración de sus componentes con una disminución de la lactosa, calcio, fosforo, grasa y caseína, y un aumento de las proteínas séricas, Cl, Na y pH. De esta manera no solo afecta a la leche sino también sus subproductos causando rancidez y gusto indeseable durante la conservación [Monardes y Barria, 1995]. Se consideran también costos indirectos el requerimiento de tiempo extra para el tratamiento y la elevada tasa de reemplazo y desecho que lleva a una pérdida del potencial genético.

La producción lechera en Argentina tiene lugar principalmente en la región pampeana, abarcando el centro oeste de la Provincia de Santa Fe, el Sudeste de la provincia de Córdoba, y el Norte, Oeste y Sur de la provincia de Buenos Aires, con aproximadamente 10.000 tambos [Gutman y col., 2003; MAGyP 2011]. También, existen cuencas menores en Tucumán, Chaco y Salta [Buelink y col., 1996]. La estructura de producción primaria se caracteriza por el elevado número de tambos localizados en diversas cuencas, mientras que la industria procesadora está estratificada, en unas pocas empresas de gran magnitud y varios centenares de pequeñas y medianas cooperativas e industrias lácteas.

A partir de la década del 90, se observó en la Argentina, un significativo aumento de la producción de leche, lo que fue acompañado de un mayor esfuerzo en mejorar la calidad higiénica de la leche y, más tarde la sanitaria, a través de un mayor control de la mastitis. El crecimiento sostenido de la producción partió en 1991, cuando tuvo un incremento de casi 636 millones de litros por año entre 1991 y 1995, mientras que en 2005 trepó a los 9.850 millones de litros. En estos últimos años la producción lechera en Argentina ha experimentado profundas modificaciones en cuanto a la cantidad y tipo de establecimientos. Si bien el número de rodeos se redujo en un 50% y el número de animales en un 15%, los niveles de producción crecieron en más de un 7%. Por su parte, la entrega media diaria por tambo se duplicó, el tamaño medio del rodeo repuntó un 70% y la producción por vaca lo hizo en más de un 25% [MAGyP 2011]. El balance de la actividad lechera en estos últimos años ha sido positivo, el mercado interno fue altamente demandante, con precios por momentos superiores a los externos, mientras que el mercado internacional presentó precios en alza, que se ubicaron entre 3.300 y 3.600 dólares

la tonelada de leche en polvo. En este contexto, tanto el sector primario como el industrial mostraron buenos niveles de rentabilidad y de crecimiento. En el año 2012 la producción láctea fue de aproximadamente 11.338 millones de litros con un proyección de crecimiento de un 5% para el año 2013 con un consumo local 8.910 millones de litros y 2.492 millones de litro en exportaciones, la distribución de la producción por Provincias ubica a Córdoba con 5700 tambos en el 37.0% , Santa Fe 32.0%, Buenos Aires 25.0%, Entre Ríos 3.10 % , La Pampa 1.4%, Santiago del Estero 0.5% y el resto de las Provincias 1.0% con un consumo local de 216 litros/Habitantes/año y los destinos de las exportaciones fueron Brasil 22.0% , Venezuela 22.0%, Argelia 13%, EEUU 4.0%, Chile 3.0%, Rusia 3.0% China 2.0% y el resto de Países el 31.0%.[Minagri 2013].

En Argentina las pérdidas de producción ocasionadas por las infecciones intramamarias (IMI) se podrían estimar en alrededor de un 2.5% mensual, lo que equivaldría alrededor de 14 millones de litros mensuales según un estudio llevado a cabo en 18 industrias nacionales con una media de 6.616 tambos [Castro, S]. Argentina está perdiendo un gran volumen de producción solo por el nivel de infección de sus rodeos. A estas pérdidas económicas hay que agregar los costos relacionados con problemas reproductivos asociados a las mastitis y los costos de reemplazo y pérdidas por eliminación de leche contaminada con antimicrobianos [Morse, 1991]. De acuerdo con Hoblet y col. (1991), un cálculo más exacto de las pérdidas por leche descartada, debería incorporar el número de días que dura la terapia más el período de carencia del producto que se está administrando, por otra parte a mayor severidad de los casos, mayor es el costo de los tratamientos [Watts y col., 1995]. Así, la mastitis bovina, cobra relevancia económica dado que afecta a

varios sectores estrechamente relacionados como son la producción, industrialización y consumo de leche. Por consiguiente, resulta prioritario el mejoramiento de la calidad de la leche y sus derivados debido al potencial aumento de la capacidad exportadora de nuestro país, principalmente en el marco del MERCOSUR [Tessi y col., 1979; Reneau y Packard, 1991].

1.1.6. Diagnóstico de mastitis bovina

Dentro de los métodos que se usan con mayor frecuencia en el campo para diagnosticar mastitis, se encuentran:

- ◆ observación y palpación de la ubre.
- ◆ pruebas físicas, como la prueba de escudilla de ordeño, prueba del paño negro y taza probadora.
- ◆ pruebas químicas, como la prueba de conductividad eléctrica de la leche, papel indicador de mastitis y prueba de whiteside que sirven también para diagnosticar mastitis subclínica.
- ◆ pruebas biológicas, como son la prueba de California para mastitis, la prueba de Wisconsin, el diagnóstico bacteriológico por los métodos de aislamiento, cultivo, tinción, pruebas bioquímicas e identificación y conteo de células somáticas por microscopia directa ó Somaticell®. La prueba de California para mastitis (CMT), es una técnica que por su simplicidad, rapidez, economía, aplicabilidad en campo y efectividad, sobre todo en manos de operadores hábiles, sigue siendo la más usada en el país para el diagnóstico de la mastitis subclínica [Faría Reyes y col., 2005].

Dentro de los métodos electrónicos actuales, el fossomatic y el counter coulter, que permiten conocer el RCS, tienen una aplicación universal sobre todo en laboratorios de control lechero o dedicados al diagnóstico e investigación de la mastitis. Estos son muy usados por su rapidez y efectividad. Como método de referencia electrónico se encuentra DeLaval cell counter; que se usa para demostrar la inflamación de la glándula mamaria y la calidad de la leche [Faría Reyes y col., 2005].

Es así que estos métodos de detección de mastitis son una herramienta que permiten identificar el tipo de infección clínica o subclínica que puede presentarse dentro de un rodeo lechero, por lo que el método que se elija para determinar las pruebas, será esencial para tener un diagnóstico más preciso [Bedolla y col., 2007].

1.1.7. Control de la mastitis: medidas profilácticas

Aunque su erradicación es virtualmente imposible debido a que existen demasiadas bacterias diferentes involucradas y algunas de ellas se encuentran presentes siempre [Carrión, 2002], algunos programas de control permiten reducir los casos de mastitis a niveles aceptables.

Los excelentes niveles de producción y calidad de la leche lograda en los países desarrollados, se relacionan con:

- ♦ El reconocimiento de la importancia de la mastitis como factor que limita la producción de leche y por tanto, la rentabilidad de las explotaciones lecheras.
- ♦ La aplicación de programas de control de mastitis y producción de leche de buena calidad.
- ♦ El desarrollo de políticas gubernamentales lecheras coherentes y bien definidas.

- ♦ El establecimiento de sistemas de vigilancia de mastitis y calidad de leche, basados en el RBT y RCS, a fin de evitar penalizaciones y acceder a los pagos de incentivos realizados por las empresas lácteas.

La aceptación e implementación de un plan de control de 5 puntos [Reneau y Packard, 1991; Sears y col., 1993] basado en la aplicación de medidas convencionales como la desinfección post-ordeño del pezón, el adecuado uso y mantenimiento del equipo de ordeño, la antibioticoterapia de los cuartos mamarios de todas las vacas al secado, el tratamiento inmediato y adecuado de todos los casos de mastitis clínicas y el descarte de vacas con infecciones crónicas ha llevado a un considerable progreso del control de los patógenos contagiosos, reduciendo marcadamente la incidencia de mastitis bovina causada por estos microorganismos. Este programa se ha actualizado y ha pasado a ser el plan de los 10 puntos, en el que se añaden, establecimiento de objetivos para la salud de la ubre, mantenimiento de un ambiente confortable, limpio y seco, mantenimiento de una buena recolección de datos, mantenimiento de la bioseguridad y monitorización regular del estatus de salud de la ubre [National Mastitis Council, 2009].

Sin embargo, estas medidas tienen menos impacto sobre la incidencia de mastitis ambientales debido a la constante re exposición de los animales a los microorganismos que infectan la ubre desde su reservorio en el medio ambiente [Fontaine y col., 2002; Potter, 2002; Leigh, 2003; Hillerton y col, 2005].

El mejoramiento de las prácticas sanitarias de manejo a nivel de las vacas dentro del rebaño necesita de mayores esfuerzos por parte de los productores, extensionistas, veterinarios y de los programas sanitarios para controlar la mastitis

[Monardes y col., 1995], los cuales deben orientarse a detectar y controlar los casos subclínicos ya que los mismos son un reservorio de infecciones que pueden diseminar los microorganismos a otras vacas.

El establecimiento y desarrollo del programa de control de mastitis debe tener como propósito principal lograr la producción de leche de calidad, cuidando la salud y vida productiva de las vacas [Avila Téllez y Gutiérrez Chávez, 2007]. Es necesario que el proyecto a ofrecer comprenda un control de los microorganismos tradicionalmente considerados responsables de producir mastitis como son principalmente las especies de *Streptococcus* o *Staphylococcus* [González y col., 1980; Rivero y col., 1984; Calvino y col., 1991 a,b], pero también que se controle el posible establecimiento de microorganismos oportunistas como bacterias SCN, coliformes, *Pasteurella sp.*, *Nocardia sp.*, *Bacillus sp.*, entre otros; con la finalidad de que se reduzca el número de infecciones intramamarias y el tiempo de duración de éstas.

Es de suma importancia que el proyecto sea comprendido y aceptado por el ganadero, así como por el personal que trabaja en la unidad ganadera, especialmente en el área de ordeño, ya que las actividades realizadas por estos trabajadores son fundamentales en la cadena de producción.

1.1.8. Tratamiento de la mastitis bovina

Si bien existen numerosos factores que influyen en la presentación de la mastitis, estos responden principalmente a la infección por microorganismos patógenos, entre los cuales algunas especies bacterianas juegan un rol particularmente importante. Considerando este aspecto, la terapia de la mastitis

clínica se focaliza fundamentalmente en la eliminación del agente infeccioso, utilizando como primera herramienta terapéutica los antimicrobianos [San Martín y col., 2002].

En medicina veterinaria los antimicrobianos comenzaron a ser utilizados en los años 50 en el tratamiento de animales enfermos y en tratamientos grupales profilácticos. En esa época se descubre la capacidad de los antibióticos de mejorar los índices de conversión y comienzan a utilizarse como promotores de crecimiento en animales de producción, principalmente en porcinos y pollos parrilleros [Errecalde y col., FAO 2004].

Durante las últimas décadas se han obtenido numerosos compuestos de incuestionable utilidad e incluso antimicrobianos de uso exclusivo en medicina veterinaria. Pero paralelamente se ha instalado el debate acerca del incremento de la resistencia a los tratamientos antimicrobianos y la consecuente amenaza contra la eficacia de los mismos.

Organismos internacionales se han involucrado en el tema y se ha instaurado un cuestionamiento no resuelto acerca de las estrategias terapéuticas utilizadas. En 1998, la Unión Europea formuló una serie de recomendaciones asentadas en el documento “The Copenhagen Recommendations” que tienen por objetivo fomentar la adopción de medidas que promuevan el uso racional de los antimicrobianos [Vibeke, 1998].

Para seleccionar adecuadamente un antimicrobiano, el médico veterinario no sólo necesita conocer el agente etiológico involucrado, sino también su sensibilidad a los antibióticos o sulfonamidas (antimicrobiano sintético) disponibles en el mercado nacional. El método de laboratorio utilizado como procedimiento de rutina para

determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes antimicrobianos, es el método estándar de difusión en agar que actualmente recomienda el Subcomité de Ensayos de susceptibilidad del Laboratorio Internacional de Referencia: National Committee for Clinical Laboratory Standard [NCCLS, 2002], que está basado en el método originalmente descrito por Bauer y col. en 1996, conocido como Método de Kirby Bauer. Este método cuenta con controles de calidad y estándares para su interpretación, está apoyado por datos clínicos y de laboratorio y ofrece una alta reproducibilidad. Este método se ha utilizado en muchos estudios de vigilancia, para evaluar los perfiles de resistencia de patógenos de mastitis [Erskine y col., 2002; Gentilini y col., 2002; Osteras y col., 2006; Botrel y col., 2010]. Sin embargo, la interpretación de los tamaños de las zonas de inhibición no es siempre constante entre los estudios y no se correlaciona bien con el método de determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Este último es una medida cuantitativa más significativa que permite una interpretación válida y la comparación entre diferentes estudios [Watts y Yancey, 1994; Kloos y Bannerman, 1994; Erskine y col., 2004]. Para la determinación de los valores de CIM se utilizan concentraciones crecientes del antibiótico a ensayar, por ejemplo el sistema comercial Trek Diagnostic Systems es uno de los más normalizados.

Para categorizar a las bacterias como susceptibles o resistentes se utilizan valores de corte tanto para el tamaño de la zona de inhibición o el CIM, según el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), anteriormente conocido como Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) [CLSI, 2008]. Sin embargo, su valor para predecir la eficacia del tratamiento de la mastitis ha sido cuestionada [Owens y col., 1997; Schwarz y col., 2010].

Dentro de los antimicrobianos más utilizados en la mastitis clínica, tanto en el ámbito internacional como nacional, están los betalactámicos, cefalosporinas, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos y sulfonamidas [Watts y col., 1995]. El empleo indiscriminado de antibióticos en medicina, veterinaria y agricultura junto con la presión selectiva que causan y los diferentes mecanismos de transferencia horizontal han acelerado el surgimiento de cepas multirresistentes e incluso cepas resistentes a altas concentraciones de los mismos, ocasionando, en algunos casos, el fracaso terapéutico que puede incluso causar la muerte del organismo infectado [Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2007].

Estudios de resistencia de diferentes especies bacterianas a antimicrobianos de uso habitual, llevados a cabo en nuestro país, mostraron en bacterias Gram positivas como *Streptococcus* sp., *S. aureus* y SCN, elevados porcentajes de cepas resistentes frente a ampicilina, amoxicilina y penicilina, [Gentilini y col., 2000; Gentilini y col., 2002]. Estos estudios reflejan el uso indiscriminado de antimicrobianos en nuestro medio y coinciden con los resultados obtenidos en otros países como Uruguay, Chile, Paraguay y Brasil [Costa y col., 2000; Gentilini y col., 2002; San Martín y col., 2002; Gianneechini y col., 2004; Florentín Aponte, 2007], reflejando así, un escaso o nulo control en lo referente a políticas de restricción en el uso de estos fármacos.

En la medida que aumenta la preocupación mundial por el tema de la multiresistencia, diferentes países han iniciado programas de monitoreo de resistencia bacteriana, fomentando el uso racional de antimicrobianos en animales de producción [Altreuther y col., 1997; Bager, 2000; Martel y col., 2000; OIE, 2004].

La Organización Mundial de la Salud señala que la resistencia a antibióticos debe ser considerada un problema grave, complejo y de repercusión internacional, recomendando poner en marcha un sistema globalizado de vigilancia de la resistencia bacteriana tanto en medicina humana como en medicina veterinaria [World Health Organization (WHO) 2001].

1.2. IMPORTANCIA DE LOS *Staphylococcus* coagulasa negativos EN LA MASTITIS BOVINA

1.2.1. Género *Staphylococcus*

El nombre deriva de las palabras griegas *staphyle* y *coccus* cuyo significado etimológico es racimo de uvas y grano, respectivamente. Rosenbach en 1884, fue probablemente la primera persona que cultivó a un estafilococo puro y que estudió sus características en el laboratorio [Kloos y Schleifer, 1986]. Observó que los aislados formaban dos tipos de colonias, únicamente diferenciables por el color: naranjas y blancas. Propuso el nombre de *Staphylococcus pyogenes aureus* para la primera y *Staphylococcus pyogenes albus* para la segunda.

Winslow y Winslow, en 1908, clasificaron los estafilococos cuyas colonias eran naranjas dentro del género *Aureococcus* y los de colonias blancas dentro del género *Albococcus*, describiendo al *Albococcus epidermidis*.

Posteriormente en 1920, Winslow y col. incluyeron al género *Staphylococcus* en la familia *Micrococcaceae*. Hucker en 1948, al realizar la revisión de la sexta edición del Manual de Bergey's, concluyó que los estafilococos y los micrococos no eran distintos, dio prioridad al nombre genérico de *Micrococcus* e incluyó a los estafilococos dentro de este género. En este mismo año, Abd-el-Malek y Gibson llamaron al grupo de estafilococos y micrococos "complejo *Staphylococcus-Micrococcus*", considerando a los estafilococos como patógenos y a los micrococos como saprófitos.

En 1955, Evans y col. propusieron separar estos organismos basándose en la necesidad de oxígeno para su crecimiento. Situaron las especies que eran aerobias facultativas en el género *Staphylococcus* y las aerobias estrictas en el género

Micrococcus. Esta clasificación fue aceptada por Breed y col. en la séptima edición del Manual de Bergey's (1957), en la misma se reconocían dos especies de estafilococos: *Staphylococcus aureus*, coagulasa positivo y con capacidad de fermentar el manitol y *Staphylococcus epidermidis*, coagulasa negativo e incapaz de fermentar el manitol. El uso de la taxonomía numérica en 1959 indicó que los estafilococos coagulasa positivos constituían un grupo homogéneo, mientras que los estafilococos coagulasa negativos no lo eran [Hill, 1959].

Baird-Parker (1963), fue el primero en reconocer tipos específicos dentro del grupo heterogéneo de los estafilococos coagulasa negativos. Dividió a los estafilococos en seis subgrupos basándose en pruebas fisiológicas y bioquímicas. Así, el subgrupo 1 contenía la especie *S.aureus*: coagulasa y fosfatasa positivas que generalmente producían ácido a partir de manitol aeróbica y anaeróticamente; los subgrupos II hasta VI eran tipos distinguibles de SCN, que se diferenciaban en la producción de fosfatasa y acetoina, así como en la capacidad de producir ácido aeróticamente a partir de la lactosa, maltosa y manitol. En 1965, Baird-Parker definió a los subgrupos del II hasta el VI como biotipos del 1 al 5, e indicó que la mayoría de estos biotipos merecerían tener el rango de especies.

Los criterios que hasta 1965 habían sido utilizados para distinguir los miembros del género *Staphylococcus* de los del género *Micrococcus* (capacidad de crecimiento anaeróbico y fermentación de la glucosa en un medio peptonado con extracto de levadura) fueron ampliamente criticados por diversos autores. A pesar de esto estaban de acuerdo en la separación de ambos géneros; así, mientras algunos argumentaban dicha separación basándose en la susceptibilidad a la furazolidona [Blanco, 1996], otros autores querían separar estos géneros en base al distinto

contenido en guanina y citosina del ADN de la especies pertenecientes a ambos géneros.

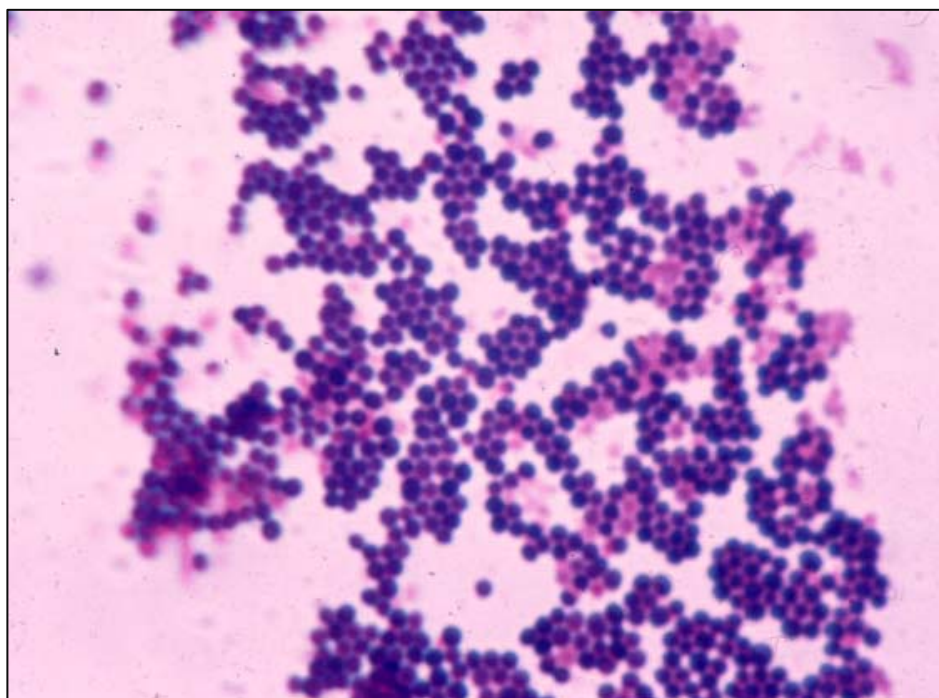
En la actualidad el género *Staphylococcus* pertenece a:

- Phylum 2 del Dominio *Bacteria*
- Clase *Bacilli*
- Orden: *Bacilliales*
- Familia *Staphylococcaceae* [*Staphylococcus* 2008]

Según el Manual de Bergey's, 2001 tiene las siguientes características:

- Son cocos Gram positivos, dispuestos de a pares, tétradas o grupos irregulares semejantes a un racimo de uva (Figura 9).
- Catalasa positivos, excepto por *S. aureus* subsp. *anaerobius* y *S. saccharolyticus*
- Anaerobios facultativos.
- Inmóviles.
- Producen ácidos a partir de glucosa, tanto en aerobiosis como anaerobiosis.
- Toleran altas concentraciones de NaCl (hasta un 10%).
- Temperatura óptima de crecimiento entre 30-37 °C.
- Las colonias son lisas, mantecosas, redondas, ligeramente convexas, de 1 a 4 mm de diámetro (Figura 10).

Algunas cepas producen pigmentos que van desde el anaranjado al amarillo pálido [Zinsser, 1994; Koneman y col., 1999].



<http://compendiomicrobiologia.wordpress.com>

Figura 9. Morfología y tinción de Gram del género *Staphylococcus*.



Figura 10. Colonias de *Staphylococcus* sp.

En la actualidad, el género *Staphylococcus* consta de 45 especies y 24 subespecies validadas, de los cuales la mayoría son SCN [Euzéby, 2012] (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Especies del género *Staphylococcus*.

| | | |
|------------------------|------------------------|----------------------------|
| <i>S. agnetis</i> | <i>S. fleurettii</i> | <i>S. piscifermentans</i> |
| <i>S. arlettae</i> | <i>S. gallinarum</i> | <i>S. pseudintermedius</i> |
| <i>S. aureus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. pulvereri</i> |
| <i>S. auricularis</i> | <i>S. hominis</i> | <i>S. rostri</i> |
| <i>S. capitis</i> | <i>S. hyicus</i> | <i>S. saccharolyticus</i> |
| <i>S. caprae</i> | <i>S. intermedius</i> | <i>S. saprophyticus</i> |
| <i>S. carnosus</i> | <i>S. kloosii</i> | <i>S. schleiferi</i> |
| <i>S. caseolyticus</i> | <i>S. lentus</i> | <i>S. sciuri</i> |
| <i>S. chromogenes</i> | <i>S. lugdunensis</i> | <i>S. simiae</i> |
| <i>S. cohnii</i> | <i>S. lutrae</i> | <i>S. simulans</i> |
| <i>S. condimenti</i> | <i>S. microti</i> | <i>S. stepanovicii</i> |
| <i>S. delphini</i> | <i>S. muscae</i> | <i>S. succinus</i> |
| <i>S. epidermidis</i> | <i>S. nepalensis</i> | <i>S. vitulinus</i> |
| <i>S. equorum</i> | <i>S. pasteurii</i> | <i>S. warneri</i> |
| <i>S. felis</i> | <i>S. pettenkoferi</i> | <i>S. xylosus</i> |

<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html#r>

Tabla 4. Subespecies del género *Staphylococcus*.

| | |
|--|--|
| <i>S. aureus</i> subsp. anaerobius | <i>S. hyicus</i> subsp. chromogenes |
| <i>S. aureus</i> subsp. aureus | <i>S. hyicus</i> subsp. hyicus |
| <i>S. capitis</i> subsp. capitis | <i>S. saprophyticus</i> subsp. bovis |
| <i>S. capitis</i> subsp. urealyticus | <i>S. saprophyticus</i> subsp. saprophyticus |
| <i>S. carnosus</i> subsp. carnosus | <i>S. schleiferi</i> subsp. coagulans |
| <i>S. carnosus</i> subsp. utilis | <i>S. schleiferi</i> subsp. schleiferi |
| <i>S. cohnii</i> subsp. cohnii | <i>S. sciuri</i> subsp. carnaticus |
| <i>S. cohnii</i> subsp. urealyticus | <i>S. sciuri</i> subsp. lentus |
| <i>S. equorum</i> subsp. equorum | <i>S. sciuri</i> subsp. rodentium |
| <i>S. equorum</i> subsp. linens | <i>S. sciuri</i> subsp. sciuri |
| <i>S. hominis</i> subsp. hominis | <i>S. succinus</i> subsp. casei |
| <i>S. hominis</i> subsp. novobiosepticus | <i>S. succinus</i> subsp. succinus |

<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html#r>

Dentro de los *Staphylococcus* coagulasa positivos (SCP), podemos citar a *S. aureus*, *S. intermedius* y algunas excepciones de *S. hyicus* [Bergey's, 1984]. Siendo

S. aureus (Figura 11), uno de los más representativos del grupo, catalasa positivo y productor de pigmentos que otorgan a las colonias un color amarillo intenso característico [Madigan y col., 2003].



Figura 11. *Staphylococcus aureus*.

Dentro de los factores de virulencia más importantes de *S. aureus* se destacan una cápsula, de naturaleza polisacárida, que actúa previniendo la fagocitosis, la proteína A en pared celular, que captura moléculas de IgG anulando la función de los anticuerpos, y productos extracelulares, los cuales se pueden clasificar en tóxicos: hemolisinas (α , β , δ , γ), leucocidinas, toxina exfoliativa o ETA-ETB (descamación de la piel), toxina de shock tóxico y enterotoxinas (estimula vómito, gastroenteritis) y no tóxicos como la catalasa, coagulasa, estafiloquinasa, DNAsa y lipasa [Seki y col., 1987; Madigan y col., 2003]. Muchas de las especies se caracterizaron en el decenio de 1970 y 1980 y algunas recientemente como en el año 2012, [<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html#r>].

Los cambios en la nomenclatura que se producen con frecuencia, llevan a que nuevas especies u otras especies previamente identificadas se encuentren para representar a la misma especie. Se continúa identificando nuevas especies de SCN, como por ejemplo *Staphylococcus fleuretti*, que fue nombrada por primera vez en 2000 [Vernozy-Rozand y col. 2000] o *Staphylococcus nepalensis*, que fue aislada de una cabra en el Himalaya, en 2003 [Spergser y col., 2003] y en vacas en el 2007 [Zadoks, 2007]. En el 2012 Taponen y col. identificaron una nueva especie de SCN novobiocina resistente, *Staphylococcus agnetis*. sp., aislada de mastitis subclínica y clínica leve de bovinos

1.2.2. *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN)

Staphylococcus coagulasa negativos son organismos ubicuos y constituyen el principal componente de la microflora normal de la piel, mucosas y glándulas de mamíferos y otros animales; esto dio lugar a que fueran considerados saprófitos y que durante años se discutiera acerca de su poder patógeno [Smith y Hogan, 1995]. La sensibilidad a la novobiocina se utiliza para clasificar a los SCN en dos grupos. Las cepas con susceptibilidad a la novobiocina incluyen entre otras especies a *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. hominis*, y entre las cepas resistentes a la novobiocina se incluyen entre otras a las especies *S. saprophyticus* y *S. xylosus*. En el siguiente cuadro se muestra la asociación entre diferentes especies de SCN, posibles hospedadores y principales enfermedades producidas [Gomes, 2007].

Cuadro 1. Asociación de SCN, hospederos y principales enfermedades.

| Especies de SCN | Hospedador | Principal enfermedad |
|------------------------|---|--|
| <i>S. hyicus</i> | Porcinos Bovinos Aves | Epidermitis exudativa Mastitis Lesiones supurativas |
| <i>S. chromogenes</i> | Bovinos | Mastitis |
| <i>S. simulans</i> | Bovinos | Mastitis |
| <i>S. xylosus</i> | Bovinos | Mastitis |
| <i>S. epidermidis</i> | Bovinos | Mastitis |
| <i>S. cohnii</i> | Bovinos | Mastitis |
| <i>S. sciuri</i> | Bovinos, Ovinos, caprinos Equinos | Mastitis Mastitis Mastitis |
| <i>S. gallinarum</i> | Aves, bovinos | Lesiones supurativas en la piel |
| <i>S. lentus</i> | Porcinos, ovinos Caprinos, aves | Lesiones supurativas en la piel Lesiones supurativas en la piel |
| <i>S. equorum</i> | Equinos | Infecciones del tracto genital |
| <i>S. haemolyticus</i> | Bovinos | Mastitis |
| <i>S. warneri</i> | Bovinos | Mastitis |
| <i>S. felis</i> | Felinos | Otitis externa |

<http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/staphylo.pdf>

1.2.2.1. Identificación de especies de SCN

Para la mastitis por SCN, como para todos los tipos de mastitis, la prevención es la clave para combatir el problema. Sin embargo, se necesitan más conocimientos y experiencia para encontrar estrategias eficaces para prevenir la mastitis causada por SCN. Sería de importancia conocer características clínicas, tendencia a la persistencia, respuesta al tratamiento, aspectos epidemiológicos,

diferencias posibles en estos rasgos entre especies de SCN, e identificación exacta de la especie relevante que causa mastitis bovina. Tales conocimientos son esenciales para el control y la prevención eficaz de la mastitis por SCN.

En el diagnóstico de la mastitis, los SCN normalmente no son identificados a nivel de especies sino son tratados como un grupo homogéneo. La identificación de especies es costosa y además no existen tratamientos específicos para las diferentes especies de SCN. Sin embargo la identificación de los SCN así como una buena caracterización de los mismos, es aconsejable por varias razones:

- para proporcionar un valor predictivo sobre si el germen aislado tiene importancia clínica o si se trata de un contaminante.
- para aumentar el conocimiento de la patogénesis de las especies estafilocócicas y así poseer información útil en estudios epidemiológicos.

En la práctica bovina, la necesidad de un método de identificación para SCN es similar que para la medicina humana. Un sistema ideal sería identificar las especies de SCN en la mastitis rápidamente y con precisión directamente de la leche, y tal vez al mismo tiempo detectar el gen de la β -lactamasa, lo que indica la resistencia a la penicilina G. Esto es importante ya que afecta la elección del tratamiento antimicrobiano y también el pronóstico de curación. También pueden determinarse la presencia de genes de resistencia a algunos otros antimicrobianos considerados importantes en relación con el tratamiento de la mastitis, [Jarp, 1991; Waage y col., 1999].

1.2.2.1.1. Métodos convencionales

Los métodos de identificación fenotípica se basan en la evaluación de la expresión de características genéticamente codificadas de aislados bacterianos. Entre los rasgos fenotípicos se incluyen morfología, características de crecimiento, capacidad de metabolizar sustratos, resistencia a los antimicrobianos, y otras características que son el resultado de la expresión del ADN, pero que no se basan en la detección del ADN bacteriano en sí.

Kloos y Schleifer (1975) fueron los primeros que describieron un esquema simplificado para la identificación de los SCN. Ellos seleccionaron caracteres claves de los estafilococos y llegaron a identificar más de un 80% de las cepas. Estos autores se basaron en los siguientes datos:

- Crecimiento anaeróbico en un medio de tioglicolato.
- Susceptibilidad a la lisostafina (50 pg/ml).
- Prueba de la coagulasa y factor de agregación (cumpling factor).
- Actividad hemolítica.
- Reducción de nitratos.
- Actividad fosfatasa.
- Producción de ácido a partir de carbohidratos bajo condiciones aeróbicas.

Sobre el esquema propuesto por Kloos y Schleifer (1975), numerosas marchas han sido desarrolladas para una adecuada y rápida identificación de estos microorganismos. Hébert y col. en 1988 propusieron un esquema de identificación que incluía pruebas de sinergismo de hemólisis, adherencia a vidrio, hidrólisis del piroglutamil-2-naftilamida y susceptibilidad a cinco antimicrobianos. Kloos y

Bannerman en 1994 a partir del método de referencia de Kloos y Schleifer, le sumaron la determinación de otras características, producción de termonucleasa, ureasa, ornitina descarboxilasa, galactosidasa, resistencia a novobiocina entre otras, lo que les permitió identificar nuevas especies. En el mismo año, Devriese y col., propusieron para la identificación de especies de SCN aislados a partir de casos de mastitis bovina, usar un esquema basado en un test simple de tres placas, por el cual se analizaban la producción de DNasa, proteasas y una placa donde se probaba sensibilidad a novobiocina, deferroxamina y fosfomicina.

Cunha y col. en el 2004, propusieron dos métodos de identificación modificados a partir del método de referencia de Kloos y Schleifer. Uno de ellos era un método simple de identificación basado en dos etapas de análisis, en una primera etapa permitía identificar un grupo de cepas mediante la fermentación de varios carbohidratos, producción de hemolisinas y crecimiento anaeróbico en tioglicolato. En una segunda etapa se empleaban una combinación de pruebas, entre ellas reducción de nitrato, producción de ureasa y resistencia a novobiocina entre otras, de acuerdo a los resultados obtenidos en la primera etapa de identificación. El otro método, descrito por Cunha y col. (2004), fue denominado método del disco y en éste también se usaban las pruebas de producción de hemolisinas y ureasa, reducción de nitrato, resistencia a novobiocina y fermentación de carbohidratos, empleándose para esta última determinación discos, disponibles comercialmente, específicos para cada azúcar.

Si bien la identificación basada en pruebas convencionales es la metodología estándar de oro para la identificación a nivel de especie de *Staphylococcus*, es laboriosa, costosa y consume mucho tiempo [Couto y col., 2001], por lo que se han

desarrollado varios sistemas comerciales rápidos y algunos automatizados para la identificación de *Staphylococcus*, principalmente SCN [Bannerman, 2003]. Entre los métodos comerciales se incluyen sistemas de prueba, como API 20 Staph (Bio Meriéux), API Staph ID 32 (Bio Meriéux), Staph-Zym (Rosco), sistema Vitek (Bio Meriéux) y otras combinaciones de pruebas bioquímicas [Bannerman y col., 1993; Devriese y col., 1994; Watts y Yancey, 1994; Ieven y col. 1995].

Matthews y col. (1990) demostraron que los sistemas API y Vitek concuerdan con los métodos convencionales en un 44,6 y 80,8% respectivamente. Otros informes mostraron que si bien el uso de sistemas comerciales como API Staph (Bio Mérieux, Francia) y *Staph-Zym*TM (Rosco, Dinamarca), tienen una exactitud entre un 70–90%, presentan el inconveniente de haber sido desarrollados principalmente para identificar cepas de origen humano [Heikens y col., 2005] y los resultados obtenidos para aislamientos bovinos no son completamente fiables por lo que requieren pruebas adicionales para la identificación final [Thorberg y Brändström, 2000; Bes y col., 2000; Couto y col., 2001].

Todas las marchas descritas hasta el momento, en base a caracteres fenotípicos, tienen resultados similares, algunas determinan quizás una especie más o una especie nueva, pero siempre queda un porcentaje de cepas que están en una ubicación intermedia debido a la variable expresión de las características fenotípicas de muchas especies de *Staphylococcus* [Bannerman y col., 1993; Ieven y col., 1995; Couto y col., 2001 Heikens y col., 2005]. Además, la interpretación de las pruebas fenotípicas puede ser subjetiva [Carretto y col., 2005].

La variabilidad en la expresión y la interpretación de las características fenotípicas son los límites de la reproducibilidad de las pruebas, es decir, la

capacidad de generar los mismos resultados cada vez que las pruebas se utilizan. Además de la reproducibilidad, la tipificación y la precisión de pruebas fenotípicas son imperfectas. Se llama tipificación a la proporción de cepas que se les asigna un tipo por un sistema de tipificación; es ampliamente usado para discriminar entre aislados pertenecientes a una sola especie o taxón, basado en marcadores fenotípicos o genotípicos [Struelens y col., 1996]. Se propone la utilización de solamente ocho pruebas bioquímicas, un número inferior a las realizadas en los métodos de referencia, para ser implementadas en laboratorios de diagnóstico para la identificación de las especies más prevalentes en Argentina.

1.2.2.1.2. Métodos moleculares

En los últimos años se han desarrollado varios métodos moleculares para la identificación de especies bacterianas los cuales usan como base de estudio al ADN. En general, los métodos genotípicos tienen mayor poder discriminatorio y reproducibilidad que los métodos fenotípicos. En particular, han permitido superar las limitaciones relacionadas con la identificación fenotípica de las especies de SCN [Heikens y col., 2005].

Entre los métodos moleculares adoptados para la diferenciación de especies, la secuenciación del ADN de genes se ha usado comúnmente en estudios filogenéticos [Takahashi y col., 1999; Ghebremedhin y col., 2008], y actualmente es un método generalmente utilizado para la identificación de especies de estafilococos y muchos otros microorganismos [CLSI, 2007a; Zadoks y Watts, 2009]. Estos métodos se utilizan para la identificación a nivel de especie y tipificación de cepas, es decir, la diferenciación de aislados a nivel de subespecie.

Secuencias de genes de una variedad de especies de SCN están disponibles actualmente para referencia en la base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health de Estados Unidos) GenBank, y se han utilizado en varios estudios recientes para la identificación de cepas de SCN aislados de muestras de leche bovina [Takahashi y col., 1997; Heir y col., 1999; Boerlin y col., 2003; Sivadon y col., 2004; Heikens y col., 2005; Sivadon y col., 2005; Capurro y col., 2009; Supré y col., 2009; Sampimon y col., 2009c]. Para la secuenciación de ADN de géneros bacterianos, el gen más usado es el 16S rRNA [Lan y Reeves, 2001] ya que parece ser el método más fiable [Boerlin y col., 2003; Zadoks, 2007], aunque su capacidad de discernimiento puede ser insuficiente para las especies afines [Patel, 2001; Heikens y col., 2005]. Es por ello que en muchas especies de SCN que están estrechamente relacionadas, la tipificación basada en el gen 16S rRNA no tiene suficiente poder discriminatorio para diferenciarlas [CLSI, 2007; Shah y col., 2007].

Otro método genotípico utilizado para la identificación de las especies de SCN incluye el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), el cual es un método basado en la restricción del ADN genómico mediante enzimas de restricción y en la subsecuente amplificación de algunos de esos fragmentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. AFLP y ribotipificación parecía ser más preciso que la prueba las pruebas fenotípicas [Taponen y col., 2007, Taponen y col., 2009].

Otro método prometedor (MALDI-TOF), *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF *Time-Of-Flight* por el detector de iones que genera huellas dactilares por la fragmentación de

la célula completa en lugar del ADN genómico [Dubois y col., 2010]. Tanto AFLP y MALDI-TOF han demostrado ser útiles para la identificación de especies de SCN bovina [Huber y col., 2011]. Lo importante es que el método de identificación por MALDI-TOF ha sido validado utilizando un gran número de cepas de SCN de referencia previamente identificados con la secuenciación de genes, mientras que el método AFLP no ha sido validado por comparación con un método de referencia [Taponen y col., 2006; Taponen y col., 2007; Dubois y col., 2010]. Estos métodos altamente discriminatorios son más caros y requieren un equipo especial y experiencia, pero su principal ventaja es que la identificación de especies y caracterización de cepas se puede hacer al mismo tiempo, debido a que su resolución excede el nivel de especie

La ribotipificación es una técnica que se basa en los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de secuencias genómicas codificantes de ARN ribosomales (rRNA 16S y 23S principalmente). Esta, permite obtener una impronta genética o "fingerprint" útil para identificar y tipificar cepas de microorganismos. Actualmente puede ser automatizada y funciona muy bien discriminando las especies de SCN [Bes y col., 2000; Carretto y col., 2005; Van Belkum y col., 2007; Taponen y col., 2008]. Otro método molecular es el análisis de tDNA-ILP [Maes y col., 1997; Heir y col., 1999; Lee y Park, 2001; Stepanovic y col., 2005; Supré y col., 2009].

En las últimas dos décadas se han desarrollado métodos genotípicos basados en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de genes constitutivos esenciales, seguido de la digestión enzimática con enzimas de restricción específicas y posterior análisis del polimorfismo de tamaño de los

fragmentos obtenidos (PCR-RFLP) y son los preferidos para la identificación a nivel de especie. Sistemas de identificación basados en la utilización de genes como *cpn60* ó *groEL* (chaperonina 60-kD), [Kwok y col. 1999; Santos y col. 2008, Onni y col., 2010; Park y col., 2011a], *dnaJ* (chaperonina 40-kD) [Shah y col., 2007], *rpoB* (subunidad beta de la RNA polimerasa) [Drancourt y Raoult, 2002; Mellmann y col., 2006], *sodA* (superóxido dismutasa A) [Poyart y col., 2001; Sivadon y col., 2004, 2005; Heikens y col., 2005], *gap* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) [Yugueros y col., 2000, 2001] y *tuff* (factor de elongación Tu) [(Goh y col., 1996; Takahashi y col., 1997; Takahashi y col., 1999; Kwok y col., 1999; Poyart y col., 2001; Martineau y col., 2001; Drancourt y Raoult , 2002; Kwok y Chow, 2003; Boerlin y col., 2003; Heikens y col., 2005;. Ghebremedhin y col., 2008; Capurro y col., 2009] se desarrollaron y aplicaron para la identificación de especies de SCN.

Entre los diferentes genes constitutivos mencionados, varios investigadores han mostrado que el gen *groEL*, el cual codifica para un polipéptido de 60-kDa (conocido como GroEL, chaperonina 60-kD, o HSP60 (*Heat Shock Protein* 60), la cual es una proteína protectora del choque térmico de 60-kD [Qoronfleh y col, 1990], es un gen altamente conservado aunque presenta variaciones de secuencia específicas de especie [Goh y col., 1996] aún mayor a las observadas en el gen del ARN ribosomal 16S (ARNr) [Kärenlampi y col., 2004]. Así, éste gen es un marcador general filogenético de utilidad para la identificación a nivel de especie dentro del género *Staphylococcus* [Segal y Ron 1996; Kwok y col., 1999; Santos y col., 2008].

Además, estudios sobre la idoneidad del fragmento conservado del gen *groEL* a través de análisis filogenéticos, han permitido identificar especies de géneros tan diversos como *Bifidobacterium* [Jian y col., 2001], *Helicobacter* [Mikkonen y col.,

2004], *Rickettsia* [Lee y col., 2003], *Vibrio* [Kwok y col., 2002], y *Enterococcus* [Teng y col., 2001], entre otros.

Al elevado poder discriminatorio, para diferenciar especies de SCN, que ofrece la amplificación y corte con enzimas de restricción del gen *groEL*, se le suma la ventaja de la reproducibilidad de los patrones de restricción y la rapidez y simplicidad de la técnica, que permite la obtención de resultados en una sola jornada.

1.2.2.1.3. Comparación de métodos fenotípicos y genotípicos para la identificación a nivel de especie de SCN

Una serie de estudios comparativos se han realizado para determinar el nivel de concordancia con métodos convencionales de referencia o genotípicos [Thorberg y Brändström, 2000; Taponen y col., 2006; Taponen y col., 2008; Capurro y col., 2009; Sampimon y col., 2009c; Onni y col., 2010; Park y col., 2011a], ya que parecería que los sistemas comerciales tienen un mal desempeño en la identificación de microorganismos aislados a partir de animales. El acuerdo entre API Staph ID y métodos convencionales en la identificación de cepas de mastitis fue del 77% [Thorberg y Brändström, 2000]. Sin embargo, utilizando la secuenciación *rpoB* como método de referencia, los niveles de acuerdo han sido sólo del 41% [Sampimon y col., 2009c]. En otro estudio, el 24% de los aislados de la especie bovina han sido identificados erróneamente por la prueba API Staph ID mediante secuenciación del rRNA 16S como método de referencia, de los cuales el 76% fueron identificados con niveles de confianza elevados [Park y col., 2011a]. Errores en la identificación podrían dar lugar a errores de interpretación y la subestimación

del impacto de las especies específicas. Sin embargo, la exactitud de los resultados de la identificación parece ser dependiente de la especie. Para el sistema API Staph ID, la identificación de *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. warneri*, y los aislados de *S. epidermidis*, en particular en animales ha demostrado ser problemática [Thorberg y Brändström, 2000; Sampimon y col., 2009c; Onni y col., 2010; Park y col., 2011a]. A medida que estas especies están frecuentemente asociadas con IIM, este sistema se considera no apto para estudiar SCN de leche de vaca [Park y col., 2011a]. Para la prueba de *Staph-Zym*TM, los resultados son variados, en un estudio llevado a cabo por Thorberg y Brändström, (2000) tuvo una buena concordancia (94%) demostrado con los métodos convencionales, aunque fueron necesarias pruebas adicionales que incrementaron el tiempo y el costo del ensayo. En un estudio utilizando la secuenciación del gen *tuf* como método de referencia, el sistema de *Staph-Zym*TM dio en un 61% de los aislamientos en leche el nombre de la especie correcta (Capurro y col., 2009). En otro estudio, sólo el 31% de los aislamientos de leche fueron correctamente identificados por el sistema *Staph-Zym*TM, sumado a que el 59% de los aislamientos no se identificaron de manera definitiva, debido a la ambigüedad de los resultados de tipificación [Sampimon y col., 2009c]. Un inconveniente importante en la identificación de las especies basándose en un número limitado de rasgos fenotípicos es que la expresión puede ser altamente variable entre las diferentes cepas dentro de las especies, lo cual compromete una correcta interpretación y la reproducibilidad de las pruebas [Watts y col., 1984; Zadoks y Watts, 2009]. La incorporación de más cepas en especies animales en las bases de datos de los sistemas comerciales mejoran su

exactitud y sensibilidad, aunque la interpretación de las reacciones débiles o aberrantes sigue siendo difícil y subjetiva.

De lo expuesto queda claro que la adecuada identificación de SCN no es aconsejable con el uso de un solo método fenotípico, sino que debe emplearse más de uno o bien combinar la identificación fenotípica con métodos moleculares.

1.2.2.2. Factores de virulencia de SCN

Diversas enzimas y toxinas extracelulares producidas por cepas de una especie bacteriana promueven la diseminación del patógeno a través del huésped. De esta manera, juegan un rol en el establecimiento y exacerbación de la mastitis. A nivel mundial numerosos estudios convencionales y moleculares han informado sobre los factores de virulencia producidos por SCN asociados a IIM [Bjorland y col., 2005, Santos Nascimento y col., 2005, Türkyilmaz y col., 2006, Taponen y col., 2007]. Las distintas especies de SCN pueden producir varias toxinas y enzimas, como α -hemolisina, desoxirribonucleasa termoestable (TNAsa), leucocidina, lipasas, proteasas, DNAsa, elastasa, exobiopolímeros (biofilm), cápsula, toxinas semejantes a la β - y δ -hemolisina de *S. aureus* y enterotoxinas A, B o C que contribuyen a su virulencia [Scheifele y col., 1987; Watts y Owens, 1987; Bedidi-Madani y col., 1998; Zhang y Maddox, 2000; Cunha y col., 2006; Türkyilmaz y Kaya 2006]. Varios estudios han indicado que los SCN aislados de mastitis bovina producen factores que inducen respuestas inflamatorias o daño tisular [Otto, 2004]. Hay una toxina, denominada δ (delta), producida por ciertos SCN, que se parece a la de *S. aureus*, la cual presenta una mayor actividad biológica [Hébert y Hancock, 1985] y está asociada con un aumento del RCS [Watts y Owens, 1987]. Lo que se pudo observar

es que muchas cepas aisladas de casos de mastitis tienen mayor actividad en las enzimas DNAsa, lecitinasa y proteasas, que aquellas cepas aisladas de vacas sanas [Zhang y Maddox, 2000]. Nemati y col., (2008) en un estudio de 102 aislamientos de SCN de 10 especies diferentes obtenidos a partir de casos de mastitis subclínica y clínica, luego del *screening* por PCR para la presencia de genes que codifican para superantígenos (Sag) entre ellos enterotoxinas, toxina del síndrome de shock tóxico toxina-1 (TSST-1) y toxinas exfoliativas, ninguna secuencia de las toxinas en estudio fueron amplificadas. Sin embargo los Sag asociados con *S. aureus* también se han encontrado recientemente en especies de SCN de origen bovino. Park y col. (2011b) en un estudio de prevalencia y distribución de 19 genes Sag entre SCN aislados de IIM bovinas, los mismos aparecieron ampliamente distribuido entre los 263 SCN que fueron evaluados, el 31,2% tenía uno o más genes Sag, de los cuales la mayoría fueron detectados en *S. chromogenes*. En coincidencia con estos hallazgos, en un estudio en Japón, entre el 60 al 70% de los aislamientos de mastitis crónicas o subclínicas, resultaron positivos para la toxina TSST-1 y similar cantidad para aislamientos productores de enterotoxinas estafilococicas (SE) [Kuroishi y col., 2003].

Estudios de adhesión e internalización de SCN en células epiteliales mamarias han revelado la capacidad adhesiva de diferentes especies de SCN, incluso mostrando semejanza con la capacidad adhesiva de *S. aureus*, pero la capacidad invasiva de *S. aureus* fue más fuerte que la de las cepas de SCN [Almeida y Oliver, 2001; Anaya-López y col., 2006; Hyvönen y col., 2007]. En infecciones con especies de SCN en humanos y animales se han detectado genes de adherencia (von Eiff y col., 2002; Seo y col., 2008.). Varios son los genes que codifican para las proteínas de adhesión MSCRAMM (componentes microbianos de

superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz). En un estudio realizado por Simojoki y col., (2012), el gen *eno*, que codifica para una proteína de unión a laminina, una proteína del grupo de las MSCRAMM, fue el detectado con más frecuencia en los SCN. Por otra parte, la producción de exobiopolímeros (biofilm) por algunas especies de SCN constituye un factor de adherencia que conduce a la formación de biofilm, el cual impide el acceso de los antibióticos al sitio blanco y actúa además como un factor antifagocitario [Bedidi-Madani y col., 1998]. Muchas veces la producción de biofilm por cepas de SCN no es un indicador confiable de patogenicidad, pero juega un papel importante en la adherencia y colonización [Alcaraz y col., 2003].

1.2.2.2.1. Producción de Proteasas

Tres proteasas se han descrito en *S. epidermidis* con diferentes especificidades de sustrato y mecanismos de acción: metaloproteasa de 32 kDa dependiente de zinc [Teufel y Götz, 1993], cisteína proteasa de 41 kDa [Dubin y col., 2001] y serina proteasa de unos 27 kDa [Ohara-Nemoto y col., 2002]. En un estudio de la serina proteasa de cepas de *S. epidermidis*, se observó la expresión de esta proteasa preferentemente en condiciones de cultivos adherentes con la técnica de membrana de diálisis, pero no en las condiciones de cultivo planctónicos, lo que sugiere un posible papel de la misma en la formación de biofilm [Ohara-Nemoto y col., 2002]. En otro estudio, la misma proteasa han sido informada como capaz de degradar el fibrinógeno, proteína C5 del complemento, y varias otras proteínas, lo que sugiere un papel de la misma en la fuga del sistema de defensa inmune [Moon y col., 2001]. Homólogos de la metaloproteasa existen en *S. hyicus* [Ayora y col, 1994]

y probablemente en *S. chromogenes*. La metaloproteasa es regulada por el sistema regulatorio de la expresión de factores de virulencia de *Staphylococcus* spp. denominado *agr* y es muy probablemente responsable de la etapa de maduración de otro factor de virulencia como las lipasas en especies de SCN como lo describió Vuong y col. (2000) para *S. epidermidis*. Dado estos resultados es de esperar que las proteasas contribuyan a la virulencia de los SCN por la degradación de los tejidos del huésped facilitando la invasión de la bacteria.

1.2.2.2. Producción de lipasas

Las lipasas al igual que las proteasas podrían promover la adhesión a la superficie de las células del huésped [Baird-Parker, 1990], además de contribuir a la virulencia al permitir que las bacterias puedan persistir en las secreciones grasas de la piel humana o de mamíferos, y posiblemente interferir con la fagocitosis. En *S. epidermidis* se ha informado que produce tres tipos de lipasas, GehC, GehD y Geh-1 [Farrell y col, 1993; Simons y col, 1998], dos de las lipasas reportadas, GehC y Geh-1, son muy similares entre sí y lo más probable es que no representen los productos de genes diferentes, sino que sean variaciones de los mismos. El reciente descubrimiento de que la lipasa GehD de *S. epidermidis* se puede unir a colágeno [Bowden y col, 2002] podría constituir un nuevo papel de la lipasa en la virulencia. También se han descrito la presencia de lipasas en cepas de *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. xylosus* y *S. warneri* [Rosenstein y Götz F. 2000] que a pesar de ser muy similares en su estructura primaria muestran diferencias significativas en sus propiedades catalítica y bioquímicas.

1.2.2.2.3. Producción de hemolisinas

Delimitar la capacidad patogénica de las diferentes especies de SCN ha sido difícil porque no tienen factores de virulencia que estén bien definidos. Estudios de citotoxicidad [Gemmell, 1983], con fibroblastos de pulmón embrionario humano demostraron que una citolisina de SCN denominada δ -toxina producía la liberación de los componentes celulares y la inflamación celular. Hébert y Hancock (1985) examinaron la capacidad de 250 cepas de 17 especies de estafilococos para producir esta hemolisina analizando la capacidad de la misma de potenciar la actividad de la β -hemolisina de *S. aureus*. Este método, denominado sinergismo de hemolisis (SH), permitió la detección rápida de un gran número de cepas de SCN capaces de producir esta citolisina. Sin embargo, la naturaleza de las toxinas citolíticas producidas por las diferentes especies de SCN no ha sido completamente aclarada. Gemmell y Thelestam (1983) informaron sobre una toxina lecitina-neutralizable que es estable al calor y citolítica producida por cepas de *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, y *S. haemolyticus*. Esta toxina se consideró similar a la δ -toxina de *S. aureus*.

Niveles elevados de RCS se observaron en cepas de *S. epidermidis* positivas al SH, pero no en cepas de *S. chromogenes* y *S. hyicus* igualmente positivas a esta prueba de sinergismo [Watts y Owens, 1987], sin embargo, los autores proponen que aquellos SCN que pueden actuar como agentes sinérgicos, nunca deben ser descartados por irrelevantes cuando son aislados de muestras clínicas ya que la actividad hemolítica entre especies en relaciones sinérgicas posiblemente podrían relacionarse con su virulencia y por lo tanto con su significancia clínica. Así, las interacciones entre las toxinas de SCN residentes y patógenos de la glándula

mamaria, como *S. aureus*, podrían permitir la colonización de la piel y el ápice del pezón. Esta área, una vez colonizada, serviría para de invasión de la glándula mamaria.

1.2.2.2.4. Producción de Biofilm

Se denomina biofilm a una capa de exopolisacáridos que se sitúa alrededor de la célula bacteriana y que no se encuentra fijada firmemente a la pared del estafilococo, por lo que puede desprenderse del cuerpo bacteriano [Wilkinson, 1983]. Además, esta capa carece de estructura regular y puede no rodear completamente a la bacteria. Podría esperarse que una capa de las características descritas alterara las propiedades superficiales de las bacterias productoras. Se explicaría así las variaciones de carga eléctrica superficial de las cepas de estafilococos, en función de la presencia o no de tal estructura [Beck y col., 1988a, b]. Igual sucedería con otras características, como la exposición o no de ciertos receptores [Whitfield, 1988], lo que justificaría el hecho aparentemente demostrado de que las cepas que presentan tales estructuras no son fagocitables o lo son con grandes dificultades [Koenig y Melly, 1965; Ohshima y col., 1988]. La producción de biofilm se ha reportado en muchas especies del SCN aisladas, especialmente en *S. epidermidis* [Tormo y col., 2005; Oliveira y col., 2006]. El biofilm impide la fagocitosis por las células del sistema inmune y también protege a las bacterias de la terapia antimicrobiana [Costerton y col., 1999; Cucarella y col., 2004; Melchior y col., 2006]. La formación de biofilm es un proceso donde las bacterias se acumulan y se adhieren a las superficies de los tejidos vivos o por ejemplo dispositivos médicos. La formación de un biofilm supone una secuencia coordinada de sucesos que incluye

una fijación inicial a la superficie primaria, la formación de microcolonias, su expansión y la diseminación de la bacteria [Tu Quoc y col., 2007]. Aunque aún se comprende poco la regulación de la formación del biofilm, se supone compleja y multifactorial [Clarke y Foster, 2006]. En la fase de proliferación se ocasiona una acumulación de células en multicapa rodeadas de una matriz polimérica de polisacárido [O’Gara y Humphreys, 2001], que contiene también proteínas de superficie responsables de la fijación de las bacterias a los distintos sustratos [Oliveira y col., 2006]. De vez en cuando algunas bacterias se desprenden del biofilm y difunden en el medio ambiente [Costerton y col., 1999; Otto, 2008].

La producción de biofilm ha sido asociada con infecciones humanas persistentes y crónicas en prótesis y dispositivos [Costerton y col., 1999]. La mayoría de los SCN aislados a partir de mastitis subclínica tienen la habilidad de formar biofilm.

Dos componentes de la superficie han sido identificados como factores importantes que intervienen en la formación de biofilm por estafilococos: el polisacárido de adhesión intercelular (PIA) [Stevens y col., 2008] y la proteína asociada a biofilm (BAP) [Rohde y col., 2005; Ziebuhr y col., 2006]. Las proteínas codificadas por los genes *icaADBC* (operón de adhesión intercelular) median en la biosíntesis de la matriz de exopolisacáridos PIA que juegan un papel importante en la adhesión célula-célula. Su asociación con la virulencia en cepas clínicas de *S. epidermidis* ha sido bien establecida [Mack y col., 1996; Ziebuhr y col., 1997; Frebourg y col., 2000; Klingenberg y col., 2007]. El operón *icaADBC* se ha identificado en una variedad de especies de SCN asociada con infecciones nosocomiales [Cramton y col., 1999; de Silva y col., 2002] y entornos de

procesamiento de alimentos [Moretro y col., 2003], lo que indica una distribución amplia de este grupo de genes entre especies de SCN. Además, el operón *icaADBC* se ha encontrado asociado con la resistencia a la meticilina en cepas de *S. epidermidis* causantes de mastitis en vacas lecheras [Sawant y col., 2009], y en cepas de *S. caprae* de leche de cabra [Allignet y col., 2001]. Sin embargo, el papel de la PIA en la patogénesis de SCN de mastitis no se ha estudiado. La proteína Bap de 2.276 aminoácidos, promueve tanto la fijación inicial como la adhesión interbacteriana, mientras que PIA interviene únicamente en adhesión interbacteriana [Cucarella y col., 2004].

Staphylococcus aureus aislados que poseen el gen *bap* son fuertes formadores de biofilm y son más a menudo asociados con la persistencia de IIM [Cucarella y col., 2004]. Se especula que la proteína Bap se proyecta desde la superficie de la célula bacteriana, promoviendo la interacción con superficies de la célula huésped, u otras bacterias [Cucarella y col., 2001]. Homólogos a la proteína Bap se han identificado también en cepas de *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. simulans* y *S. xylosus* aisladas de mastitis por hibridación usando el gen *bap* de *S. aureus* como sonda [Tormo y col., 2005]. Bap está implicada en la unión primaria así como en la siguiente etapa de agregación bacteriana, posiblemente en cooperación con PIA [Cucarella y col., 2001; Cucarella y col., 2004]. Sin embargo, Bap también pueden mediar la formación de bifilms en ausencia de PIA, lo que indica que la expresión de Bap representa un mecanismo alternativo de formación de biofilm [Tormo y col., 2005]. Es evidente que los estafilococos pueden utilizar diferentes mecanismos para formar un biofilm. En varios estudios, la presencia de genes del operón *icaADBC* no se correlacionan completamente con la

producción in vitro de biofilm, lo que indica que otros mecanismos están probablemente involucrados [Mack y col., 1996; Allignet y col., 2001; Vasudevan y col., 2003; Chokr y col., 2006].

A la luz de los conocimientos actuales aún es desconocido si la formación de biofilm juega un papel importante en la patogénesis de las diferentes especies de SCN asociadas con IIM.

1.2.2.3. Signos clínicos y RCS en IIM por SCN

Según los estudios de cambios histopatológicos causados por la infección de *Staphylococcus* en las glándulas mamarias de bovinos, la infección por SCN causa daños en la glándula mamaria, pero posiblemente menos graves que los ocasionados por la infección por *S. aureus* [Boddie y col., 1987, Trinidad y col., 1990, Benites y col., 2002]. Por lo general los signos de mastitis causada por SCN son leves, se presentan como una ligera hinchazón en la ubre y cambios en la apariencia de la leche [Nevala y col., 2004; Koivula y col., 2007].

Existen claras evidencias, principalmente en casos subclínicos ó clínicos suaves, de una relación directa entre la presencia de SCN y un elevado RCS, como también una reducida producción de leche [Baba y col., 1980; Trinidad y col., 1990; Blowey y Edmondson, 1995; Kudinha y Simango, 2002; Faría Reyes y col., 2005; de Haas y col., 2004], además de un daño en los tejidos secretores [Gentilini y col., 2002]. Trinidad y col. (1990a) informaron que los cuartos de las vaquillonas infectadas con SCN exhibieron una mayor infiltración de leucocitos y más estroma interalveolar en comparación con los controles no infectados, lo que resulta en una

actividad secretora reducida. Benites y col. (2002) estudiaron los parénquimas mamarios de las vacas lecheras sacrificadas debido a mastitis y reportaron que la presencia de SCN se asoció con una respuesta inflamatoria crónica, principalmente seguida por la reparación y lesiones leves en los tejidos.

Diferentes investigadores sostienen que el rol de los SCN como agentes etiológicos de mastitis bovina no está completamente claro, ya que, por un lado, incrementan el recuento de células somáticas en la glándula mamaria, alterando la calidad de la leche y, por otro, contribuyen a mantener una elevada barrera leucocitaria previniendo la colonización de otros patógenos mamarios [Mathews y col., 1991; Nickerson y Boddie, 1994].

Numerosos estudios reportan un aumento significativo pero moderado en RCS en cuartos con IIM de SCN en comparación con cuartos no infectados [Timms y Schultz, 1987; Hogan y col., 1987; Davidson y col., 1992; Chaffer y col., 1999; Taponen y col., 2007; Gillespie y col., 2009; Schukken y col., 2009; Sampimon y col., 2009b; Piepers y col., 2010a; Paradis y col., 2010]. Oliver y Jayarao, (1997) informaron elevaciones de RCS en infecciones por SCN en dos a tres veces comparados con cuartos sanos, incluso mencionan que puede darse un aumento de hasta diez veces (Taponen y col., 2007). Otros estudios por el contrario indican que es poco importante el nivel de RCS en infecciones por SCN, pero cuando la prevalencia de las infecciones por SCN es alta en el rodeo, podría contribuir significativamente al RCS del tanque [Rainard y col., 1990; Davidson y col., 1992; Schukken y col., 2009; Piepers y col., 2009a; Sampimon y col., 2009b].

Existe un debate acerca de si las especies de SCN son más patógenas unas que otras. En algunos estudios, se han observado diferencias en el RCS en IIM

provocadas por distintas especies de SCN [Sampimon y col., 2009b], pero no en otros [Hogan y col., 1987]. En un ensayo experimental con *S. simulans* se observó una respuesta inmune innata un poco más fuerte que en *S. epidermidis* [Simojoki y col., 2011]. Por otra parte, *S. hyicus* y *S. chromogenes* han sido descritas como las especies más patógenas [Myllys, 1995; Zhang y Maddox, 2000].

Thorberg y col., (2009) informaron que las mayoría de las IIM persistentes con *S. chromogenes*, *S. epidermidis* y *S. simulans* ocasionaron desde una leve a una fuerte reacción inflamatoria, medida con la Prueba de Mastitis de California (CMT), mientras que IIM con otras especies no demostraron persistencia y tuvieron un bajo puntaje en el CMT. En cambio, Taponen y col (2006) no encontraron diferencias en la gravedad de IIM causadas por diferentes especies de SNC.

En un estudio llevado a cabo por Paradis y col. (2010a), en muestras compuestas de leche de vacas primíparas infectadas con SCN (n=168/1691), tuvieron en el primer mes de la lactancia, RCS más altos en comparación con el resto de animales no infectados

En un estudio belga sobre los efectos de patógenos específicos en las IIM durante la primera lactancia [Piepers y col., 2010a], obtuvieron un aumento moderado de RCS en las vacas primíparas infectadas por SCN (n=55/155): la media geométrica de RCS fue de 75 000 cél/ml en las vacas infectadas por SCN y 53 000 cél/ml en las vacas no infectadas. Aquí el diagnóstico bacteriológico estuvo basado en dos muestras consecutivas de leche después del parto. En otro estudio en Bélgica, la media geométrica de RCS con IIM de SCN fue de 137.000 cél/ml [Supré y col., 2011].

Sin embargo en otro estudio, Van den Borne y col. (2010) no observaron diferencias de RCS entre IIM debido a *S. chromogenes* y otras especies. Las medias geométricas de RCS en leche de cuartos eran 225.700 cél/ml en cuartos infectados con *S. chromogenes*, 130.000 cél/ml en cuartos con *S. simulans* y, 84 600 cél/ml en cuartos con *S. xylosus* [Supré y col., 2011]. Los autores concluyeron que los RCS elevados de IIM de *S. chromogenes*, *S. simulans* y *S. xylosus* fueron comparables con IIM causadas por *S. aureus*.

En modelos experimentales de mastitis con SCN, vacas desafiadas con *S. chromogenes* desarrollaron mastitis clínica leve con signos locales y la producción de leche disminuyó en promedio un 16,3% durante 7 días después de la exposición [Simojoki y col., 2009].

1.2.2.4. Persistencia de las IIM por los SCN

En muchos casos, las IIM de SCN desaparecen poco después del parto [Myllys y Rautala, 1995; Aarestrup y Jensen, 1997], aunque las IIM de SCN en el preparto pueden persistir en la lactancia [Taponen y col, 2007]. Las tasas de curación espontánea de las IIM de SCN se cree que son altas [Harmon y col, 1989; Deluyker y col, 2005; Taponen y col, 2006]. Sin embargo, muchas de las infecciones SCN tienen un larga duración y a menudo persisten hasta el final de la lactancia [Timms y Schultz, 1987; Rainard y col., 1990; Chaffer y col., 1999; Taponen y col., 2007]. Un estudio llevado a cabo por Todhunter y col. (1993) reveló IIM persistentes por SCN, con una duración media de 222 días, de las cuales 55% fueron causadas por *S. chromogenes*. De 63 IIM con SCN detectadas en un rodeo, alrededor de la mitad

se encontró que eran persistentes, y ninguna diferencia clara fue observada en la duración de las infecciones ocasionadas por las dos especies predominantes de SCN, *S. chromogenes* y *S. simulans*, [Taponen y col., 2007]. En otro estudio, con IIM en el parto, las infecciones a *S. simulans* persisten con mayor frecuencia en la lactancia que las infecciones con *S. chromogenes* y *S. epidermidis*. Estos resultados sugieren que *S. simulans* se adapta mejor a la glándula mamaria bovina. [Aarestrup y Jensen, 1997]. Thorberg y col. (2009) muestreando las vacas dos veces con un mes de diferencia, encontraron que del 58 % al 76% de las IIM con *S. chromogenes*, *S. epidermidis* y *S. simulans* persisten, mientras que la mayoría de las IIM con SCN de otras especies son eliminadas dentro de un mes. Las infecciones por *S. epidermidis* fueron principalmente transitorias en un estudio [Aarestrup y Jensen, 1997], pero persistentes en otros [Taponen y col, 2007; Thorberg y col, 2009]. Algunas vacas parecen ser capaces de eliminar fácilmente las infecciones de SCN, mientras que otras no lo son, pero los factores del huésped implicados son difíciles de determinar. Alternativamente, algunas especies o cepas de los SCN pueden estar mejor adaptadas a la ubre que otras. Las posibles explicaciones de la persistencia de bacterias en la glándula mamaria son la adherencia a las células epiteliales mamarias, formación de biofilms, y la supervivencia intracelular, que se ha demostrado in vitro para varias especies de SCN [Almeida y Oliver, 2001; Tormo y col., 2005; Anaya-López y col., 2006; Hyvonen y col., 2009]. Sin embargo, poco se sabe acerca de estos mecanismos en vivo.

1.2.2.5. Factores que predisponen las IIM por SCN

En un estudio de factores de riesgo en Bélgica encontraron que la falta de higiene en vaquillonas, la falta de inmersión de los pezones antes del ordeño, y las ubres sin el recortado de pelos, provocó un aumento en las probabilidades de IIM por SCN [Piepers y col., 2011]. En un estudio holandés, otros factores de riesgo asociados con IIM por SCN, fueron la fuente de agua no potable y el pastoreo al aire libre, el porcentaje mayor de prevalencia fue en los tambos con RCS >250.000 cél/ml [Sampimon y col., 2009b]. La naturaleza de algunos de estos factores de riesgo también parece indicar que las infecciones por SCN en los rodeo, se originan en el medio ambiente.

En las bacterias que establecen una IIM como resultado del ingreso en la glándula mamaria a través del canal del pezón, existe una probable asociación entre el número de organismos en la punta del pezón y la incidencia de nuevas infecciones. Sorprendentemente, la colonización del pezón en el parto con SCN en vaquillonas, no se encontró asociada con un mayor riesgo de IIM de SCN en el inicio de lactancia [Piepers y col., 2011]. Por otra parte, no hay información disponible a cerca de las especies específicas de SCN que intervienen en la colonización del pezón e IIM. Así, por ej. no se ha encontrado asociación entre la colonización del pezón con *S. chromogenes* en el parto y la IIM en vaquillonas al inicio de la lactancia con el mismo patógeno [De Vlieghe y col., 2003]. Estos hallazgos sugieren que las diferentes especies de SCN que pueden intervenir en la colonización del pezón no necesariamente conducen a una IIM.

1.2.2.6 ¿Los SCN protegen contra las IIM bovinas por los patógenos principales?

Estudios llevados a cabo en ganado lechero sugieren que la colonización del pezón o la piel del canal del pezón por SCN podría tener efecto protector contra algunos agentes patógenos de mastitis sin tener los efectos negativos de una IIM [Schukken y col., 1989; Matthews y col., 1990; De Vliegher y col., 2003; Piepers y col., 2011].

Parker y col. (2007) mostraron que la IIM pre parto por SCN en vaquillonas aumentó el riesgo de infección post-parto con SCN, *S. aureus* ó *S. uberis*. Resultados similares se informaron en otro estudio en Nueva Zelanda [Compton y col., 2007]. En cambio De Vliegher y col. (2004) demostraron *in vitro* a través de estudios con *S. chromogenes*, que cepas de esta especie inhiben el crecimiento de *S. aureus* y *Streptococcus* sp. Ellos sugirieron que el efecto se debió a sustancias inhibitorias producidas por *S. chromogenes*. Otro estudio informó que algunas cepas de SCN inhibían el crecimiento de uno de los principales patógenos de la mastitis *S. agalactiae* [Santos Nascimento y col., 2005].

Todavía se carece de información precisa acerca de los posibles efectos de protección de los SCN contra los principales patógenos de la mastitis, se supone que podrían ser el aumento de RCS en la leche de los cuartos infectados o bacteriocinas producidas por las bacterias [Matthews y col. 1990; De Vliegher y col., 2004]. Además se le suma el problema de limitar la colonización de la piel del pezón y canal del pezón ya que los SCN pueden invadir la ubre y así desarrollar una IIM. En el preparto es donde hay colonización de los pezones con SCN que protege

contra IIM en vaquillonas causadas por los principales patógenos ambientales y contagiosos en el inicio de la lactancia [Piepers y col., 2011].

Además, una tasa de incidencia significativamente menor de mastitis clínica se ha observado durante la primera lactancia en vaquillonas infectadas con SCN al momento del parto en comparación con vaquillonas no infectadas [Piepers y col., 2010a].

Los mecanismos propuestos para la protección conferida por patógenos menores es que se establecen en la colonización del pezón por: exclusión competitiva de otros patógenos de mastitis, la producción de sustancias inhibidoras, o la estimulación de la inmunidad innata de las ubres [Santos Nascimento y col., 2005; Piepers y col., 2009b]. Así, el efecto inhibidor de los SCN en IM contra el crecimiento de los llamados principales patógenos sigue siendo teórico y es poco probable que este fenómeno sea de importancia práctica en el control de la mastitis. Las discrepancias observadas entre los estudios pueden atribuirse a diferencias en la exposición experimental, modelos de estudio, o especies de SCN implicadas.

1.2.2.7. Significancia de las IIM por SCN

Los SCN, que por lo general eran considerados flora oportunista de la piel y agentes patógenos menores de mastitis bovina [Devriese y De Keyser., 1980; Boddie y col., 1987] sobre todo en comparación con los principales agentes patógenos tales como *S. aureus* y *S. agalactiae*, e incluso con frecuencia ignorados en el marco de control de la mastitis [Harmon y Langlois, 1989, 1995]. En estos últimos años están emergiendo como potenciales bacterias responsables de IIM en las explotaciones lecheras modernas. [Smith y Hogan, 2001; Gentilini y col., 2002;

Janosi y Baltay, 2004; Pitkala y col., 2004, Taponen 2008; Pyörälä y Taponen, 2009; Sansano 2010] siendo frecuentemente los más aislados [De Vliegher y col., 2004; Calvino y Tirante, 2005; Cunha y col., 2006; López Meza y col., 2006; Tenhagen y col., 2006; Taponen, 2008; Sampimon y col., 2009; Thorberg y col., 2009; Park y col., 2011; Laport y col., 2012; Piessens y col., 2012; Quirk y col., 2012; Simokoki y col., 2012].

Existen claras evidencias, principalmente en casos subclínicos, de una relación directa entre la presencia de SCN y un elevado RCS, como también una reducida producción de leche [Baba y col., 1980; Trinidad y col., 1990; Kudinha y Simango, 2002; Faría Reyes y col., 2005], además de un daño en los tejidos secretores [Gentilini y col., 2002].

Investigaciones llevadas a cabo en diferentes países muestran aislamientos de SCN a partir de muestras de leche provenientes tanto de vacas con mastitis clínicas leves como de vacas con mastitis subclínica de larga duración [Devriese y De Keyser, 1980; Nickerson y Boddie, 1994; Frigerio y col., 1995; León, 1997; Chaffer y col., 1998; Costa y col., 2000; Kudinha y Simango, 2002; Taponen y col., 2006; Parker y col., 2007; Taponen y Pyörälä, 2009; Persson Waller y col., 2011].

En nuestro país estudios llevados a cabo en establecimientos lecheros del centro de la Provincia de Córdoba [Rampone y col., 1993] en la cuenca lechera santafesina [Delgado y col., 1998] y en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos y La Pampa [Gentilini y col., 2002] muestran una alta prevalencia de SCN en leche proveniente de vacas con mastitis clínica y subclínica. Debido al exhaustivo control de los principales patógenos, los SCN han adquirido en estos últimos años mayor importancia como patógenos de la mastitis bovina.

1.2.2.8. Impacto de los SCN sobre la calidad de la leche

La infección por SCN induce una reacción inflamatoria en la ubre lo que aumenta las concentraciones de diversos marcadores de la respuesta inflamatoria como N-acetil- β -glucosaminidasa (NAGasa) ó proteína amiloide sérica A en leche (MAA) [Pyörälä y Syväjärvi, 1987; Myllys, 1995; Pyörälä y Pyörälä, 1998; Simojoki y col., 2009] y causa daños en el tejido mamario, lo que lleva a disminución en la producción de leche [Milne y col., 2004]. Un aumento del RCS se asocia generalmente con menor producción de leche [Hortet y Seegers, 1998]. La reducción en la producción de leche asociada con RCS de 200 000 cél/ml en vacas primíparas fue de 0,4 a 5%, y 3 a 11% en las vacas multíparas sin mastitis clínica. Las pérdidas de producción se incrementaron con el RCS superior [Hagnestam-Nielsen y col., 2009]. Además, el aumento de RCS en la leche debido a infecciones persistentes por SCN, afecta de manera importante la calidad de la leche, [Timms y Schultz, 1987; De Vliegher y col. 2005]. Sin embargo, Paradis y col (2010) encontraron que la presencia de infecciones con SCN en el primer mes de lactancia tuvo un efecto negativo en el RCS durante toda la primera lactancia, pero ningún efecto significativo sobre la producción de leche

1.2.2.9. Prevalencia de SCN en mastitis bovina

Estudios recientes consideran a los SCN como patógenos emergentes, los cuales están adquiriendo cada vez mayor participación en las infecciones de los rebaños lecheros [De Vliegher y col., 2004; Pitkala y col., 2004; Calvinho y Tirante, 2005; Cunha y col., 2006; López Meza y col., 2006; Tenhagen y col., 2006; Bradley y

col., 2007; Piepers y col., 2007; Taponen, 2008; Sampimon y col., 2009a; Persson Waller y col., 2011; Piessens y col., 2012]. Si bien la proporción de SCN aislados de casos de mastitis clínica sigue siendo muy bajo en muchos países [Olde Riekerink y col., 2007, Botrel y col., 2010], estos microorganismos se han convertido en los patógenos predominantemente aislados de mastitis subclínica en varias cuencas lecheras [Tenhagen y col., 2006; Koivula y col., 2007; Lim y col., 2007].

La prevalencia de cuartos infectados por SCN varía entre los rebaños desde valores elevados del 35% al 75% [Trinidad y col. 1990; Pankey y col., 1991; Matthews y col. 1992; Rajala-Schultz y col. 2004; Cunha y col., 2006; López Meza y col., 2006; Tenhagen y col., 2006] a bajos porcentajes, del 10 al 19% [Oliver y Mitchell, 1983; Pankey y col., 1991; Aarestrup y Jensen, 1997]. La variación puede ser al menos en parte debido a las diferencias en el muestreo y las técnicas de diagnóstico, haciendo difíciles las comparaciones entre los estudios. Otros factores de importancia son la parición y la etapa de lactancia. Sistema de vivienda y el nivel de producción también puede ser de importancia. Por ejemplo, las vaquillonas en sistemas de pastoreo tienen una baja prevalencia de IIM por SCN [Compton y col., 2007], mientras que las vacas sometidas a un sistema de producción intensiva de leche, presentan mayor frecuencia IIM por SCN [Gröhn y col., 2004].

Según varios estudios, la prevalencia más alta de SCN se presenta en vaquillonas alrededor del parto [Oliver y Sordillo, 1988; White y col., 1989, Aarestrup y Jensen, 1997; Piepers y col, 2010]. También se ha visto que la prevalencia de SCN es mayor en vacas durante su primer lactancia (primíparas) que en vacas de mayor edad [Matthews y col., 1992; Honkanen-Buzalski y col., 1994, Myllys, 1995;

Poelarends y col., 2001; Tenhagen y col., 2006], por lo que es probable que los SCN sean en gran parte responsables de eventuales pérdidas de producción [Baba y col., 1980; Trinidad y col., 1990; Kudinha y Simango, 2002; Faría Reyes y col., 2005; Taponen, 2008; Thorberg y col., 2008; Pyörälä, y Taponen, 2009; Sansano, 2010].

1.2.2.10. Epidemiología de la mastitis por SCN

1.2.2.10.1. Reservorios de SCN en rodeos lecheros

Las diversas especies de SCN no constituyen un grupo uniforme: algunos son más contagiosos que otros y varían en su virulencia. Si bien se han llevado a cabo numerosos estudios para identificar los reservorios de SCN, todavía no es clara la epidemiología de la mastitis por SCN. Este grupo de microorganismos han sido aislados de diferentes sitios del cuerpo de las vacas y terneras, secreciones de la ubre, de la leche y del medio ambiente [Devriese y De Keyser, 1980; Boddie y col., 1987; White y col., 1989, Trinidad y col., 1990; Matos y col., 1991, Matthews y col., 1992; Oliver y col., 2004]. Una amplia gama de especies de SCN, entre ellas, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri* y *S. xylosus* fueron aislados en diversos estudios de muestras de leche, canales del pezón, piel del pezón o piel de otros sitios del cuerpo [Devriese y De Keyser, 1980; Boddie y col., 1987, Trinidad y col., 1990; Watts y col., 1991; Matthews y col., 1992; Aarestrup y col., 1995; Chaffer y col., 1999], *Staphylococcus xylosus* y *S. sciuri* mostraron ser parte de la microbiota normal de la piel bovina y del entorno (camas) y medio ambiente de las vacas [Matos y col., 1991] al igual que

S. saprophyticus y *S. cohnii* que también resultaron ser comunes en el medio ambiente del ganado vacuno.

En contraste a los SCN aislados de la leche, que son sensibles a novobiocina, los SCN procedentes principalmente del medio ambiente de la vaca son novobiocina resistentes [Devriese, 1979].

Si bien los SCN son patógenos importantes en el ganado bovino de todas las edades, las especies predominantes de SCN causantes de infección parecen diferir entre los grupos etarios. Así, *S. chromogenes* es la principal especie aislada de novillas pre-parto y vacas primíparas [Trinidad y col., 1990; Rajala-Schultz y col., 2006; Taponen y col., 2006], mientras que *S. simulans* es en su mayor parte aislado de vacas en lactancia [Waage y col., 1999, Taponen y col., 2006]. Si bien *S. chromogenes* ha demostrado ser la especie predominante de SCN aislada de la leche de los bovinos [Trinidad y col., 1990; Matthews y col., 1992; Nickerson y col., 1995; Aarestrup y Jensen, 1997; De Vliegher y col., 2004; Rajala-Schulz y col., 2004], también fue aislado de la piel del ápice del pezón, el canal del pezón y la glándula mamaria de novillas aproximadamente de 10 meses de edad [Boddie y col., 1987 ; De Vliegher y col., 2003]. *Staphylococcus chromogenes* también se encontró con frecuencia colonizando otros sitios del cuerpo como nariz, pelo, vagina y el canal del pezón de las novillas [White y col., 1989]. En el estudio de De Vliegher y col. (2003), el 20% de las novillas tenían al menos un ápice del pezón colonizado por *S. chromogenes* y la prevalencia de la colonización del ápice del pezón con esta especie aumentó con la edad. Esto sin embargo no fue asociado con la IIM por el mismo agente.

Estudios sobre IIM de SCN muestran una amplia variación con respecto a las especies más aisladas: si bien *S. chromogenes* es la especie predominante en la mayoría de los estudios, otras especies también han resultado comúnmente aisladas, como *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. simulans*, *S. haemolyticus* y *S. xylosus* [Matthews y col, 1992; Aarestrup y Jensen, 1997; Chaffer y col, 1999; Rajala-Schultz y col, 2004; Taponen y col, 2006; Thorberg y col, 2009; Sampimon y col, 2009b; Park y col, 2011a]. Un número de especies de SCN más raramente asociados con IIM se han aislado con frecuencia en otros estudios, tales como *S. sciuri*, *S. capitis*, *S. intermedius*, y *S. hominis* [Davidson y col, 1992; Chaffer y col, 1999; Sampimon y col, 2009b].

Aunque los SCN causan la mayoría de IIM en vaquillonas, no se considera que tengan un impacto significativo en la producción futura de leche o salud de la ubre [Piepers y col., 2009a]. Por el contrario, las infecciones de SCN en vaquillonas recién paridas se han asociado con la producción de leche más elevada y una menor incidencia de mastitis clínica en la primera lactancia [(Piepers y col., 2010]. Se necesitan más estudios para dilucidar en qué medida específica influyen el patógeno así como los factores relacionados con el huésped con la incidencia y persistencia de la IIM por SCN para llegar a conclusiones sobre la epidemiología de las infecciones por este grupo bacteriano en el ganado vacuno lechero

1.2.2.10.2. Epidemiología molecular de SCN

Un requisito previo importante para llevar a cabo la investigación epidemiológica es la exactitud de la identificación de especies. Recientemente, se ha demostrado que la especiación del SCN sobre la base de pruebas bioquímicas no es

lo suficientemente precisa para la identificación de SCN de origen bovino [Sampimon y col., 2009]. Por lo tanto, se han propuesto métodos moleculares para mejorar la diferenciación de especies de SCN y convertirlos en una importante herramienta de diagnóstico [Santos y col., 2008; Capurro y col. 2009, Zadoks y Watts, 2009]. Los métodos genotípicos utilizados incluyen entre otros, el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) [Taponen y col., 2006, 2007], ribotipado [Carretto y col., 2005], análisis de tDNA-ILP [Maes y col., 1997; Heir y col., 1999; Lee y Park, 2001; Stepanovic y col., 2005] y secuenciamiento del ADN [Heir y col., 1999; Sivadon y col., 2004; 2005; Heikens y col., 2005]. Entre los géneros bacterianos, la secuencia de ADN más común es el rARN 16S [Lan y Reeves, 2001]. Sin embargo, muchas especies de SCN están estrechamente relacionadas, y la tipificación basada en la secuencia 16S no tiene suficiente poder discriminatorio para diferenciar todas ellas [Shah y col. 2007]. Por lo tanto, se ha implementado la utilización de genes “housekeeping” en los sistemas de identificación de especies de SCN como por ejemplo el gen *groEL*, el cual codifica un polipeptido de 60 kDa (chaperonina del shock térmico) [Kwok y col. 1999], el gen *dnaJ* (proteína 40 del shock térmico) (Shah y col. 2007), *rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa) [Drancourt y Raoult, 2002; Mellman y col. 2006], *sodA* ([superóxido dismutasa A) [Poyart y col. 2001; Sivadon y col. 2004, 2005; Heikens y col. 2005] y el gen *tuf* (un factor de elongación) [Heikens y col. 2005].

Entre tales métodos, el polimorfismo de restricción del gen *groEL*, representa un método eficaz ya que ha demostrado ser un marcador de ADN universalmente ideal para la identificación de *Staphylococcus* a nivel de especie debido a que es un

gen bien conservado entre muchas especies, pero con suficientes secuencias variables para la específica identificación de especies. [Santos da Silva y col., 2008].

En general, los métodos genotípicos tienen mayor poder de discriminación, y reproducibilidad que los métodos fenotípicos. Sin embargo, si el laboratorio no tiene acceso a los mismos la caracterización de las especies de SCN debe remitirse a pruebas bioquímicas básicas y fundamentales tales como: la reacción de la coagulasa, resistencia a novobiocina, utilización de hidratos de carbono, actividades enzimáticas e hidrólisis de sustratos, entre otras, por lo que la mayoría de los esquemas de identificación fenotípica de especies son laboriosos y demandan varias jornadas de trabajo. De allí la importancia de seleccionar pruebas fisiológicas y bioquímicas que permitan ser implementadas en los laboratorios de diagnóstico veterinario de rutina, para la rápida y sencilla identificación de especies de SCN con significancia clínica en la mastitis bovina. Esto permitiría tomar decisiones rápidas en el tratamiento y así limitar la duración y la posible diseminación de la enfermedad.

Teniendo en cuenta el lugar de preferencia de las especies de los SCN, las vías de transmisión y las fuentes potenciales de IIM pueden diferir entre especies (Cuadro 2). En la actualidad, la epidemiología de los SCN es poco conocida, por lo que las recomendaciones de medidas de control son difíciles. Además estudios basados en la identificación de especies y una precisa tipificación molecular serán necesarios para mejorar la comprensión de las fuentes y las rutas de transmisión de las diferentes especies del SCN más relevantes en la salud de la ubre.

Cuadro 2. Aislamientos de SCN de reservorios extramamarios en rodeos lecheros

| Reservorios | La mayoría de especies aisladas de SCN | Referencias |
|--|---|--|
| Canal de pezón | <i>S. chromogenes</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i> | [Trinidad y col., 1990] ₂ |
| Piel del pezón | <i>S. chromogenes</i> , <i>S. hyicus</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. haemolyticus</i> | [Matthews y col., 1992] ₂ [Devriese y Dekeyser, 1980] ₁ |
| Piel de la ubre, otros sitios del cuerpo | <i>S. xylosus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. sciuri</i> | [White y col., 1989] ₁ [Baba y col., 1980] ₁ [White y col., 1989] ₁ |
| Cama, manos del ordeñador | <i>S. equorum</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> | [Thorberg y col., 2006] ₁ [Taponen y col., 2008] _{2,3} |

Identificación de especies de acuerdo con:

₁ Esquema de identificación bioquímica [Kloos y Schleifer, 1975; Devriese y Dekeyser, 1980; Devriese y col., 1985; Langlois y col., 1988.]; ₂ API Staph-Trac sistema; ₃ Ribotipificación

1.2.2.11. Terapia antimicrobiana de los SCN.

Las estrategias para el tratamiento de las mastitis ocasionadas por SCN varían entre los diferentes países. En algunos países la mastitis subclínica es tratada durante la lactancia, pero en otros la mastitis subclínica y clínica leve son a menudo dejadas sin tratar sobre la base de que SCN serán eliminados de forma espontánea

Varios investigadores han informado tasas de curación espontánea de las mastitis por SCN en el rango del 16% al 70% [Deluyker y col., 2005; Taponen y col., 2006; Thorberg y col., 2009; Supré y col., 2011]. Las tasas de cura bacteriológica reportadas están entre un 70% - 90% luego del tratamiento con antimicrobianos β -lactámicos [Rainard, y col., 1990; McDougall, 1998; McDougall, y col., 2007; Pyörälä y Pyörälä, 1998; Waage y col., 2000]. Las tasas de cura bacteriológica en mastitis ocasionadas por SCN penicilina-resistentes resultaron ser más bajas, en un estudio Taponen y col, (2006) mostraron una tasa de curación de mastitis bacteriana por SCN del 86% con el tratamiento intramamario a bencilpenicilina, mientras que para los aislamientos resistentes a la penicilina la tasa de curación fue del 66,7%. Las diferencias en las tasas de curación después del tratamiento antimicrobiano entre las especies pueden ocurrir, pero hasta la fecha hay pocos informes al respecto. [Van den Borne y col., 2010]. En un meta-análisis realizado por Halasa y col. (2009) se informó para *Staphylococcus* spp. (SCN y *S. aureus*) un aumento de las tasas de curación de las infecciones con terapia de la vaca seca, pero no hubo evidencia que el tratamiento fuera capaz de prevenir nuevas infecciones.

La duración óptima del tratamiento de las mastitis ocasionadas por SCN no se conoce, pero de acuerdo con el estudio de Deluyker y col. (2005), un tratamiento que se extendió por 8 días no mejoró las tasas de curación de mastitis, ocasionadas por SCN, en comparación con un tratamiento de 2 días.

El tratamiento al parto durante la primera lactancia mostró que el número de IIM fue menor y aumentó la producción de leche en las vaquillonas que fueron tratadas con antibióticos en comparación con aquellas sin tratamiento [Oliver y col., 2003]. Sin embargo en otros estudios, no se demostró diferencias en la producción

de leche entre las vaquillonas tratadas y no tratadas [Middleton y col., 2005; Borm y col., 2006]. El tratamiento antimicrobiano de las vaquillonas antes del parto no protegió de las nuevas infecciones durante la lactancia [Oliver y col., 2004; Middleton y col., 2005; Borm y col., 2006], y las IIM nuevas durante la lactancia temprana fueron tan comunes en cuartos mamarios tratados con antibióticos, como en cuartos sin tratar [Oliver y col., 2004]. Si es necesario, la terapia antimicrobiana puede ser utilizada para tratar la mastitis clínica causada por SCN, en casos subclínicos persistentes y para la terapia de vaca seca. Al respecto debe considerarse el riesgo de los residuos de antibióticos en la leche de las vaquillonas tratadas durante el preparto, en un estudio realizado en EEUU en la Universidad de Connecticut, fueron detectados residuos de antibióticos en el 28; 8,8 y el 3.7% de muestras de leche obtenidas al tercer, sexto y décimo día postparto, respectivamente [Andrew y col., 2009]. Por ello se recomienda la detección de residuos de antibióticos en la leche obtenida después del parto de vaquillonas sometidas a una terapia con antibióticos al preparto, para reducir el riesgo de consumo e industrialización de la leche contaminada con residuos, lo que resulta potencialmente peligroso para la salud humana y para la fabricación de productos fermentados especialmente.

1.2.2.11.1. Resistencia a antimicrobianos en cepas de SCN

La emergente resistencia de los SCN a los antimicrobianos es una preocupación en la medicina veterinaria y humana. En comparación con *S. aureus*, los SCN tienden a ser más resistentes y desarrollar fácilmente multiresistencia [Myllys y col., 1998]. Los patrones de resistencia difieren entre las especies y las

regiones [Sampimon y col., 2011]. La mayoría de los mecanismos de resistencia se basan en la producción de β -lactamasa, lo que se traduce en resistencia a la penicilina G y aminopenicilinas [Taponen, 2008]. Diferentes porcentajes de cepas de SCN aislados de mastitis con resistencia a la penicilina han sido informados desde valores no tan elevados (~30%) [Gentilini y col., 2002; Pitkälä y col., 2004; Nevala y col., 2004; MARAN, 2003; NORM-VET, 2005; Persson Waller y col., 2011] hasta valores superiores al 85% [Sampimon y col., 2011].

La resistencia de las bacterias frente a los antimicrobianos, principalmente a los β -lactámicos presenta un grave problema, pues es probablemente el grupo de antibióticos más utilizados en el tratamiento de la mastitis bovina.

Los antibióticos β -lactámicos son una amplia clase de antibióticos que contienen un anillo β -lactámico en su estructura molecular. El modo de acción de estos antibióticos es la inhibición de la síntesis de peptidoglicano, componente de la pared celular bacteriana. La barrera de peptidoglicanos es importante para la integridad estructural de la pared celular, especialmente para los microorganismos Gram positivos. El paso final de la síntesis de los peptidoglicanos, la transpeptidación, se facilita por unas transpeptidasas conocidas como "penicillin binding proteins" (PBPs, proteínas de unión a penicilinas) [Daza Pérez, 1998].

Los β -lactámicos son análogos del D-alanil-D-alanina, el aminoácido terminal de las subunidades peptídicas precursoras de la barrera de peptidoglicano que se está formando. La similitud estructural que existe entre los antibióticos β -lactámicos y la D-alanil-D-alanina facilita su anclaje al sitio activo de las PBPs. El núcleo β -lactámico de la molécula se une irreversiblemente al PBP. Esta unión irreversible evita el paso final (la transpeptidación) de la formación de la barrera de

peptidoglicanos, interrumpiendo la síntesis de la pared celular. Es posible, además, que la inhibición de las PBPs (mediante dicha unión irreversible), haga también que se activen enzimas autolíticas de la pared celular bacteriana.

Los tres grandes mecanismos de resistencia a β -lactámicos son: trastornos en la permeabilidad, hidrólisis enzimática y alteración del sitio blanco [Vignoli y Seija, 2008]. Los trastornos de permeabilidad se corresponden fundamentalmente con la disminución de la expresión de porinas; no es un mecanismo que por sí mismo promueva altos niveles de resistencia, pero puede ser muy importante en conjunción con distintos tipos de β -lactamasas. La hidrólisis enzimática implica la inactivación de los β -lactámicos como consecuencia de la acción de enzimas que reciben el nombre de β -lactamasas, codificadas por el gen denominado *blaZ*, este es el principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos. [Odd y Maeland, 1997; Vignoli, y Seija, 2008]. Las β -lactamasas son enzimas bacterianas capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico de las penicilinas (penicilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina), dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana. Actualmente este mecanismo de resistencia es muy frecuente tanto en *S. aureus* como en las diferentes especies de SCN y su diseminación es mundial.

Sin embargo, las penicilinasas estafilocócicas se inhiben con inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam) y por tanto estas cepas resultan sensibles a las combinaciones de β -lactámico con inhibidor de β -lactamasas. Asimismo estas penicilinasas no hidrolizan las penicilinas semisintéticas (oxacilina, meticilina, cloxacilina, nafcilina) ni tampoco las cefalosporinas ni las carbapenemas que mantienen su actividad antiestafilocócica.

Las penicilinas semisintéticas, por ej.: oxacilina, meticilina, estables a la β -lactamasa estafilocócica, gracias a la ubicación estratégica de ciertas cadenas laterales en la molécula, fueron desarrolladas específicamente para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus* sp. productores de β -lactamasa. Sin embargo, la resistencia a este tipo de antibióticos pronto apareció debido a la modificación del sitio blanco de acción de los β -lactámicos, este mecanismo de resistencia se da debido a la expresión de un gen alternativo, que codifica una PBP básicamente distinta a la existente, es el caso de la expresión del gen *mecA* el cual codifica para una PBP alternativa, denominada PBP2a que es menos afín a la totalidad de los β -lactámicos. El gen *mecA*, está localizado en un elemento genético móvil denominado “Cassette Cromosómico de *Staphylococcus*” (SCCmec). De esta manera la resistencia se adquiere por incorporación del cassette al cromosoma de cepas susceptibles [Vignoli y Seija, 2008, Berglund y col., 2008; Soares y col., 2012]. La resistencia a la meticilina/oxacilina implica resistencia a todos los betalactámicos, incluyendo penicilinas, combinaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa, cefalosporinas, monobactamas y carbapenemas.

Teniendo en cuenta las posibles diferencias en susceptibilidad entre las especies del SCN, podrían ocurrir variaciones en la respuesta a la terapia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la frecuencia de aislamiento de especies de SCN a partir de muestras de leche bovina con diferentes RCS provenientes de tambos ubicados en la cuenca lechera de Villa María, Córdoba, mediante un método genotípico y un esquema bacteriológico simplificado.

Evaluar en los aislamientos de SCN en estudio la producción de factores de virulencia, formación de biofilm y susceptibilidad antimicrobiana y su asociación con los respectivos determinantes genéticos.

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar los aislamientos de SCN mediante el polimorfismo de los fragmentos de restricción de la secuencia parcial del gen *groEL* (PCR-RFLP).
2. Diseñar un esquema simple, rápido y de fácil implementación en laboratorios de diagnóstico veterinario para la identificación presuntiva de especies de SCN con significancia clínica en la mastitis bovina.
3. Comparar los resultados de la identificación de especies de SCN por el método molecular y métodos convencionales.

4. Evaluar la producción de factores de virulencia: lipasas, proteasas, sinergismo de hemólisis.
5. Evaluar la formación de biofilm y distribución de genes asociados.
6. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana e investigar presencia y distribución de genes *mecA* y *blaZ* en los aislamientos resistentes a β -lactámicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas de *Staphylococcus* utilizadas en este trabajo fueron:

Cepas de referencia

- Cepas de referencia de *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN): cepas pertenecientes a la colección americana de cultivos, American Type Culture Collection (ATCC): Las siguientes cepas tipo se incluyeron en este estudio: *Staphylococcus capitis* ATCC 27840, *Staphylococcus chromogenes* ATCC 43764, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970, *Staphylococcus hyicus* ATCC 11249, *Staphylococcus simulans* ATCC 27848, *Staphylococcus warneri* ATCC 27836, *Staphylococcus xylosus* ATCC 29971, como cepas controles en el ensayo molecular PCR-RFLP del gen *groEL*.
- Cepas de referencia de *Staphylococcus* coagulasa positivos (SCP): *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *S. aureus* RN6390, *S. aureus* V329, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 como cepas controles en los siguientes ensayos: coagulasa en tubo, PCR-RFLP del gen *groEL*, sinergismo de hemólisis, presencia de genes asociados a biofilm y resistencia a antibióticos.

Cepas de campo

- Trescientas dos (302) cepas de SCN aisladas a partir de muestras de leche de tambos de la región centro-sur de la provincia de Córdoba en el marco del proyecto PICTO-UNRC N° 30368, durante el periodo Marzo-Septiembre de 2007, y caracterizadas a nivel de especie por una marcha bacteriológica convencional y el kit comercial *Staph-Zym*TM durante el desarrollo de mi Tesis de Maestría en Biotecnología [Bonetto, 2010; Oddi, 2008; Dieser y col, en prensa; Vissio y col, 2013]. Se trabajó con aislamientos de SCN no asociados a otros microorganismos.

3.1.2. Medios de cultivo y drogas

Las drogas y los materiales utilizados fueron de grado analítico de las marcas Lab. Britania SA., Lab. Cicarrelli, Rosco, Diagnostic, Lab. Sigma, Lab. Anedra y Biokar Diagnostics.

Los medios de cultivo empleados fueron preparados según las recomendaciones del fabricante y se agregó agar a razón de 15 g/L a los caldos cuando fue necesario obtener medios sólidos.

- Agar Tripticasa Soya (TSA).
- Mueller Hinton Agar (AMH).
- Agar cerebro-corazón (BHIA)
- Caldo Tripticasa Soya (TSB).
- Medio de cultivo para Ureasa
- Agar DNAsa

- Agar Bair–Parker

Los medios elaborados en el laboratorio fueron preparados según se describe a continuación:

- Medio base OF suplementado con xilosa

| | |
|--------------------------|---------|
| Peptona ó triptona..... | 2 g |
| NaCl | 5 g |
| Azul de bromo timol..... | 3 ml |
| Agar..... | 3 g |
| Agua destilada..... | 1000 ml |

Se preparó solución stock al 10% del azúcar xilosa. Para el carbohidrato a ensayar se agregó un volumen de la solución stock al medio base OF hasta una concentración final del 1%.

- Agar Sangre de Carnero: se agregó sangre de carnero desfibrinada al 5% a un medio base (TSA) estéril, fundido y mantenido a 45 °C.

- Caldo Rojo de Metilo – Voges Proskauer (RM/VP)

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Peptona..... | 7 g |
| Glucosa..... | 5 g |
| K ₂ PO ₄ | 5 g |
| Agua destilada..... | 1000 ml |

- Agar P (Phillips y Nash, 1985):

| | |
|---------------------------|------|
| Peptona | 10 g |
| Extracto de levadura | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Glucosa | 1 g |

Agar 15 g

Agua destilada ... 1000 ml

- Agar PNP [Langlois y col., 1989]:

p-nitrofenilfosfato disódico (0.495 g/mL) 0.1 mL

Agar P 100 mL

- Agar Leche 2 % para prueba de proteasa:

Se preparó 50 ml de una suspensión de leche descremada en polvo al 4 % en agua destilada y se autoclavó. A 50 ml de BHIA 2 X fundido y mantenido a 50°C se agregó 50 ml de la suspensión de leche descremada al 4 % en esterilidad. Esterilizo el medio preparado a vapor fluente durante 10 min.

- Caldo urea:

Extracto de levadura 0.1 g

Urea 20 g

KH₂PO₄ 9.1 g

Na₂HPO₄ 9.5 g

Rojo fenol (0.2%) 0.01 g

pH 6.8 +/- 0.2

Agua destilada c.s.p. 1000 mL

- Caldo Tripticasa Soya suplementado con glucosa al 1% (TSBG):

Se adicionó la glucosa al medio TSB y se autoclavó 15 min a $\frac{3}{4}$ de atmósfera.

Todos los medios de cultivos elaborados en el laboratorio fueron esterilizados durante 15 min a 121°C. Para la preparación del agar PNP y el agar sangre los sustratos, p-nitrofenilfosfato disódico (esterilizado por filtración) y sangre de carnero

(extraída en condiciones de asepsia), fueron adicionados a los medios respectivos, agar P y TSA ya estériles, fundidos y enfriados a 45-50°C.

3.1.3. Soluciones y reactivos

- Solución de α -naftol al 5%

α -naftol.....5g

Alcohol etílico absoluto.....100mL

- Solución de KOH al 40%

KOH.....40g

Agua destilada.....100mL

- Solución de Rojo fenol 0.2%:

Rojo fenol 1 g

Agua destilada 500 mL

- Solución de p-nitrofenilfosfato 0.495 g/mL

p-nitrofenilfosfato disódico 4.95 g

Agua destilada 10 mL

- Solución fisiológica (SF):

NaOH 0.9 g

Agua destilada 100 mL

- Solución de azul de bromotimol al 1%

- Solución de cloruro de bario al 1% (para escala de McFarland) (Tabla 7 y Figura 12)

- Solución de ácido sulfúrico al 1% (para escala de McFarland) (Tabla 7 y figura 12)

- Solución de ácido clorhídrico 0,1N
- Solución de glucosa al 1%.
- Solución de Cristal Violeta (CV) al 2% (2 g de cristal violeta, 20 ml de alcohol 95%, 0,8 g de oxalato de amonio y 80 ml de agua destilada)
- PBS pH 7.6

3.1.4. Compuestos

- para-nitrofenilfosfato de amonio (Sustrato para la prueba de fosfatasa).
- Emulsión de yema de huevo c/telurito (suplemento para Bair–Parker)
- Acido acético glacial puro (Anhedra)

3.1.5. Discos y placas de antibióticos comerciales

- Novobiocina 5 µg (Britania)
- Placa Sensititre (Rosco, Diagnostic) (Los antibióticos y concentraciones ensayadas se detallan en la figura 7)

3.1.6. Soluciones para la extracción de ADN cromosomal

- Solución Stock de EDTA 0,5 M (pH 8):

EDTA dihidratado 186,1 g/l, granallas de NaOH, agua destilada. El EDTA se disolvió mezclado con 800 ml de agua utilizando un agitador magnético, y la solución se ajustó al pH deseado en un principio con granallas de NaOH y luego con NaOH 1N. La solución se llevó a volumen final con agua y se esterilizó en autoclave durante 15 min. a 121°C.

- Solución Stock de Tris Cl 1M (pH 8).

Tris base 121,1 g/l, HCl concentrado, agua destilada. El Tris base se disolvió mezclado con 800 ml de agua, luego se adicionó un volumen de HCl 4N de manera de lograr el pH deseado [Sambrock, 1989]. Se llevó a volumen final con agua y la solución se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C.

- Buffer TE 1X (pH 8): Tris.Cl 10 mM pH 8 - EDTA 1 mM pH 8.
- Lisostafina 0,5 mg/ml.

3.1.7. Compuestos y soluciones para la amplificación de ADN

La mezcla de reacción fue preparada a partir de los siguientes reactivos y soluciones stock alcanzando un volumen final de 50 µl:

- Cebadores para la amplificación del gen groEL:
H279A: (5'-GAIIGCIGGIGA(TC)GGIACIACIAC-3')
H280A: (5'-(TC)(TG)I(TC)(TG)ITCICC(AG)AAICCIIG-GIGC(TC)TT-3')
- Solucion de dNTPs (Desoxirribonucleico trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP): 100 mM (Promega)
- Buffer Taq Green 5X: (pH 8,5), MgCl₂ 7,5 mM (Promega)
- GoTaq DNA Polimerasa: 500 U, concentración 5 U/µl (Promega)
- MgCl₂: 25 mM (Promega)
- Agua destilada libre de nucleasas (Promega)

3.1.8. Compuestos y Enzimas de Restricción (Promega) para la digestión enzimática de los productos amplificados por PCR

- Albúmina Sérica Bovina 10X: 10 mg/ml (Promega)
- Agua destilada libre de nucleasas (Promega)
- Buffer B 10X: 60mM Tris-HCl (pH 7,5), 500mM NaCl, 60mM MgCl₂ y 10mM DTT (Promega)
- Buffer MULTI-CORE 10X: 250 mM Tris acetato (pH 7,8), 1M acetato de potasio, 100 mM acetato de magnesio y 10 mM DTT

Enzimas de Restricción: *AluI*, *HindIII* y *PvuII* (Tabla 5).

Tabla 5. Enzimas de Restricción utilizadas para la obtención de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen *groEL*.

| Enzima | Concentración | Secuencia de reconocimiento | |
|------------------------|---------------|--|-------------------------------|
| <i>AluI</i> (500U) | 10 U/μl | 5'...AG [▼] CT...3' 3'...TC [▲] GA...5' | <i>Arthrobacter luteus</i> |
| <i>HindIII</i> (5000U) | 10 U/μl | 5'...A [▼] AGCT T...3' 3'...T TCGA [▲] A...5' | <i>Haemophilus influenzae</i> |
| <i>PvuII</i> (1000U) | 12 U/μl | 5'...CAG [▼] CTG...3' 3'...GTC [▲] GAC...5' | <i>Proteus vulgaris</i> |

3.1.9. Compuestos y soluciones para electroforesis en gel de agarosa

- Agarosa LE, Analytical Grade (Promega)
- Buffer TBE 5X: 54 g Tris base, 27,5 g de Ácido bórico, 20 ml EDTA 0,5 M (pH 8), agua destilada para llevar a volumen final de 1 litro.
- Bromuro de etidio 0.5 μg/mL (Sigma)
- Marcadores de peso molecular 100 bp (RBC), 1kb (Invitrogen)

3.1.10. Cebadores para la detección de los genes *icaA*, *icaB*, *icaD*, *bap* y *eno*.

En la Tabla 6 se especifican los cebadores, tamaño de amplicones y las cepas control usadas para la amplificación de diferentes genes asociados a la formación de biofilm según la bibliografía consultada [Vasudeman y col., 2003; Seo y col., 2008; Vautor y col., 2008; Hussain, 2011; Simojoki y col., 2012].

Tabla 6. Cebadores y cepas control para la amplificación por PCR de genes asociados a biofilm.

| Genes | Proteína codificada | Secuencia de nucleótidos | Tamaño de amplicones (pb) |
|--------------|-----------------------------------|---|---------------------------|
| <i>bap</i> | proteína asociada a biofilm | 3'-CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC-5' 5'-GCTGTTGAAGTTAATACTGTAOCTGC-3' | 971 ₁ |
| <i>ica A</i> | proteína de adhesión intercelular | 3'-CCTAACTAACGAAAGGTAG-5' 5'-AAGATATAGCGATAAGTGC3' | 1315 ₂ |
| <i>ica B</i> | proteína de adhesión intercelular | 3'-ATGGCTTAAAGCACACGACGC-5' 5'-TATCGGCATCTGGTGTGACAG-3' | 526 ₂ |
| <i>ica D</i> | proteína de adhesión intercelular | 3'-AAACGTAAGAGAGGTGG-5' 5'-GGCAATATGATCAAGATAC-3' | 381 ₂ |
| <i>eno</i> | proteína de unión a laminina | 3'-ACGTGCAGCAGCTGACT-5' 5'-CAACAGCATCTTCAGTACCTTC-3' | 302 ₂ |

₁*S. aureus* V329 (Vautor y col., 2008) ; ₂*S. aureus* ATCC 25923 (Simojoki y col., 2012)

3.1.11. Cebadores para la detección de los genes *blaZ* y *mecA*.

En la Tabla 7 se detallan los cebadores, tamaño de amplicones y la cepa control usadas para la amplificación de los diferentes genes asociados con la

resistencia a β -lactámicos según la bibliografía consultada [Sawant y col., 2009, Soares y col., 2012].

Tabla 7. Genes blanco, cebadores, programas de PCR y tamaño de amplicones

| Genes | Proteína codificada | Secuencia de nucleótidos | Tamaño de amplicones (pb) |
|-------------|--|--|---------------------------|
| <i>blaZ</i> | β -lactamasa | 5'-AAGAGATTGCTATGCTTC-3' 5'-GCTTGACCACTTTTATCAGC-3' | 517 ₁ |
| <i>mecA</i> | proteína de unión a la penicilina alterada (PBP2a) | 5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3' 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3' | 533 ₁ |

₁*S. aureus* ATCC 43300

3.1.12. Compuestos y soluciones para la prueba de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Los antibióticos utilizados en este trabajo para determinar el perfil de resistencia, son los recomendados [CLSI, 2008], para las cepas de *Staphylococcus* sp. aislados de origen animal y generalmente utilizados en los rodeos lecheros para el tratamiento de la mastitis bovina.

Los estándares de turbidez de McFarland que van de 0.5 a 10, se usan como referencia de suspensiones bacterianas para estimar el número de ufc/ml. Estos estándares son creados al mezclar soluciones de cloruro de bario al 1% con ácido sulfúrico al 1% en volúmenes específicos (Tabla 8, Figura 12).

Tabla 8. Relación entre la concentración de cloruro de bario/ácido sulfúrico y el título de una suspensión bacteriana.

| Tubo | BaCl ₂ 1% | H ₂ SO ₄ 1% | ufc/ml |
|------|----------------------|-----------------------------------|-------------------|
| 0,5 | 0,05 | 9,95 | $1,5 \times 10^8$ |
| 1 | 0,1 | 9,9 | $3,0 \times 10^8$ |
| 2 | 0,2 | 9,8 | $6,0 \times 10^8$ |
| 3 | 0,3 | 9,7 | $9,0 \times 10^8$ |
| 4 | 0,4 | 9,6 | $1,2 \times 10^9$ |
| 5 | 0,5 | 9,5 | $1,5 \times 10^9$ |
| 6 | 0,6 | 9,4 | $1,8 \times 10^9$ |
| 7 | 0,7 | 9,3 | $2,1 \times 10^9$ |
| 8 | 0,8 | 9,2 | $2,4 \times 10^9$ |
| 9 | 0,9 | 9,1 | $2,7 \times 10^9$ |
| 10 | 1,0 | 9,0 | $3,0 \times 10^9$ |

**Figura 12.** Tubos correspondientes a los diferentes patrones de la escala de McFarland.

Los antibióticos utilizados en el sistema comercial Trek Diagnostic Systems y su concentración en los pocillos para determinar la CIM, se encuentran en la Figura 13.

Figura 13. Antimicrobianos incluidos en el sistema comercial Trek Diagnostic Systems.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-----------|-----------|
| A | CHL 2 | CHL 4 | CHL 8 | CHL 16 | ERI 0,25 | ERI 0,5 | ERI 1 | ERI 2 | ERI 4 | CLY 0,5 | CLY 1 | CLY 2 |
| B | DAP 0,5 | DAP 1 | DAP 2 | DAP 4 | OXA 0,25 | OXA 0,5 | OXA 1 | OXA 2 | OXA 4 | STR 1000 | DT1 | DT2 |
| C | GEN 2 | GEN 4 | GEN 8 | GEN 16 | AMP 0,12 | AMP 0,25 | AMP 0,5 | AMP 1 | AMP 2 | AMP 4 | AMP 8 | FOXS 6 |
| D | LZD 1 | LZD 2 | LZD 4 | LZD 8 | PEN 0,06 | PEN 0,12 | PEN 0,25 | PEN 0,5 | PEN 1 | PEN 2 | PEN 4 | PEN 8 |
| E | RIF 0,5 | RIF 1 | RIF 2 | RIF 4 | VAN 0,25 | VAN 0,5 | VAN 1 | VAN 2 | VAN 4 | VAN 8 | VAN 16 | VAN 32 |
| F | ZXT 0,5/0,5 | ZXT 1/19 | ZXT 2/38 | ZXT 4/76 | LEVO 0,25 | LEVO 0,5 | LEVO 1 | LEVO 2 | LEVO 4 | CIP 1 | CIP 2 | POS |
| G | SYN 0,5 | SYN 1 | SYN 2 | SYN 4 | TGC 0,03 | TGC 0,06 | TGC 0,12 | TGC 0,25 | TGC 0,5 | NIT 32 | NIT 64 | VAN |
| H | TET 2 | TET 4 | TET 8 | TET 16 | NXF 0,25 | NXF 0,5 | NXF 1 | NXF 2 | NXF 4 | GEN 500 | NEG | POS |

CHL Cloranfenicol
DAP Daptomicina
GEN Gentamicina
LZD Linezolid
RIF Rifampicina
SXT Trimetoprima / sulfametoxazol
SYN Quinupristina / dalfopristina
CLI Clindamicina
CIP Ciprofloxacina

OXA+ Oxacilina+2%NaCl
AMP Ampicilin
PEN Penicilina
VAN Vancomicina
LEVO Levofloxacina
TGC Tigeciclina
MXF Moxifloxacina
ERY Eritromicina

NIT Nitrofurantoina
DT1 D Test 1
DT2 D Test 2
FOXS Cefoxitina (screen)
NEG Control Negativo
POS Control Positivo
TET Tetraciclina
STR Streptomicina

3.1.13. Aparatos e instrumental

- Micropipetas (P200 y P1000).
- Erlenmeyer, pipetas, probetas, tubos de ensayo, cajas de Petri.
- Frascos (vidrio) y tapas.

- Hisopos, tips, gradillas, Eppendorfs.
- Ansas en rulo y en punta, pinza metálica.
- Porta objetos y cubre objetos.
- Tubos plásticos con tapa.
- Material envoltorio, Parafilm, marcador, cinta de papel, regla graduada.
- Balanza electrónica.
- Vórtex.
- Mechero de Bunsen.
- Microscopio óptico.
- Espectrofotómetro.
- Heladera con freezer.
- Baño termostatzado.
- Estufa de cultivo.
- Microondas.
- Autoclave.
- Baño de cultivo con agitación (shaker).
- Flujo Laminar.
- Termociclador PTC-220 (MJ Research Inc.).
- Fotodocumentador *MiniBIS Pro* (BioAmérica).
- Lector de Microplacas (Labsystems Multiskan M.S.)

3.2 Métodos

3.2.1. Identificación a nivel de especie de SCN por la técnica de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción del producto de amplificación por PCR del gen *groEL* (PCR-RFLP del gen *groEL*)

3.2.1.1. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó según las condiciones descritas por Aires de Souza y col. (1997) con ligeras modificaciones. Las bacterias crecidas durante toda la noche sobre placas con agar tripticasa soya (TSA) fueron recogidas con ansa estéril, resuspendidas en 20 µl de TE 1X (pH 8), y lisadas por 40 min a 37°C con lisostafina (0,5 mg/ml). Esto fue seguido por un paso de desnaturalización a 95°C durante 15 min. La mezcla fue centrifugada a 13.000 rpm por 5 min, y 5 µl del sobrenadante fue usado como templado de ADN para la reacción de PCR.

3.2.1.2. Amplificación de ADN por PCR

Las reacciones de amplificación de ADN se realizaron según Santos y col., (2008). Inicialmente, se preparó una mezcla de reacción con todos los componentes para una amplificación de ADN por PCR. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 50 µl conteniendo 5 µl de ADN molde, 0,5 µg de cada cebador, 250 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (Promega, Madison, USA), 1,5 mM MgCl₂, 2 U de *Taq* DNA- polimerasa (Promega), *buffer* Go*Taq* Green 5X de amplificación y agua libre de nucleasas.

En todas las reacciones se realizó un control negativo colocando en un tubo todos los componentes excepto el ADN, el cual fue reemplazado por un volumen igual de agua. La ausencia de amplificación en este control asegura que la amplificación observada en el resto de los tubos es debida al ADN de la muestra y no a la presencia de contaminantes en los componentes de la reacción o en los materiales empleados. La amplificación fue llevada a cabo en un Termociclador PTC-220 (MJ Research Inc.).

La amplificación consistió de un ciclo de predesnaturalización a 95°C durante 3 min, seguido por 40 ciclos de amplificación (1 min de desnaturalización a 93°C, 1,30 h de *annealing* a 37°C y 2 min de elongación a 72°C). Se incluyó en todas las amplificaciones un paso de extensión final a 72°C durante 8,30 min.

3.2.1.3. Digestión enzimática de los productos de PCR

La digestión enzimática del ADN amplificado se llevó a cabo con 5 µl del producto de PCR en un volumen total de 20 µl empleando *Buffer* B 10X o MULTI-CORE 10X según la enzima utilizada, 2 µg de BSA acetilada 10X, agua libre de nucleasas y enzima de restricción *AluI* (5U), según Barros y col. (2007) y las enzimas *HindIII* (8U) y *PvuII* (9,6U) según Santos y col. (2008). Ambas digestiones se realizaron mediante una incubación a 37°C durante 2 hs.

La doble digestión con *HindIII* y *PvuII* fue realizada para la identificación de las especies *S. chromogenes*, *S. hyicus* y *S. capitis* ya que el perfil de fragmentos de la restricción enzimática obtenido por digestión con *AluI* no permite diferenciar claramente cada especie.

3.2.1.4. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos obtenidos luego de la reacción de amplificación, así como de las digestiones enzimáticas fueron corridos en geles de agarosa.

Para la cuantificación de los productos de amplificación se utilizaron geles de agarosa al 1% en *buffer* TBE 1X teñidos con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Un volumen de 5 µl de cada muestra fue sembrado en cada calle del gel.

La corrida electroforética correspondiente a los productos de amplificación fue llevada a cabo durante 50 min a 75 V y el peso molecular de los productos amplificados se confirmó por comparación con un marcador de bajo peso molecular (1 Kb, Invitrogen).

Por otro lado, los productos digeridos con las enzimas de restricción fueron corridos en geles de agarosa 3,5% teñidos con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en *buffer* TBE 1X. Se sembraron 7 µl de cada uno de los productos digeridos y 4µl de marcador de peso molecular 100 bp. La corrida electroforética se realizó a 75 V durante 2 hs.

Los geles fueron visualizados en un fotodocumentador *MiniBIS Pro* (BioAmérica), y almacenados en formato TIFF (Tagget Image Files Format) para su posterior análisis.

3.2.1.5. Análisis de RFLP del gen *groEL*

Las fotografías de los patrones de bandas obtenidos fueron almacenadas en forma digital. El tamaño de los fragmentos fue determinado por comparación con el marcador de bajo peso molecular (100 bp). Una vez comparados los patrones de

bandas obtenidos de la PCR-RFLP del gen *groEL* de las cepas de referencia con secuencias conocidas de la base de datos NCBI GenBank, utilizando el programa de NEBcutter (versión 2.0; Vincze y col., 2003), se identificaron los aislamientos de SCN a nivel de especie. El gen *groEL* fue secuenciado en los aislamientos cuyos perfiles de PCR-RFLP resultaron diferentes de las cepas de referencia.

3.2.2. Identificación de especies de SCN mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas: marcha bacteriológica convencional simplificada

Para la identificación de aquellas especies de SCN aisladas preferentemente de muestras de leche bovina, se siguió un esquema simple diseñado para este trabajo en base a la bibliografía consultada [Kloos y Schleifer, 1975; Thorberg y Brändström, 2000; Cunha y col., 2004; Koneman y Allen, 2008, ABIS, ENCYCLOPEDIA, 2012].

El conjunto de pruebas bioquímicas y fisiológicas para cada una de las especies de SCN (Tablas 9-16) extraídas de ABIS, ENCYCLOPEDIA, 2012, fueron la base para el diseño del esquema propuesto. Esto resultó una tarea laboriosa dado el número importante de características que fueron evaluadas, que las diferentes especies comparten un número importante de pruebas bioquímicas, que solo unas pocas permiten diferenciarlas y además la mayoría de las especies de SCN presentan variabilidad en los resultados.

Tabla 9. Características culturales y bioquímicas de *Staphylococcus chromogenes*

| Staphylococcus chromogenes | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------|
| Hemolisis | Pigmento carotenoides | Diámetro de la colonia>5mm (48h) | | Crecimiento aeróbico | Crecimiento ananeróbico | lactosa | Trealosa | Manitol | Xilitol |
| (X) | (X) | (X) | | (+) | (X) | (+) | (+) | (=) | (-) |
| Reducción de nitrato | Fosfatasa alcalina | Rafinosa | Xilosa | Sacarosa | Ureasa | Crecimiento en NaCl 10% | Crecimiento en NaCl 15% | Producción de ácido L-Láctico | |
| (+) | (+) | (-) | (-) | (+) | = | (+) | (-) | (+) | |
| Producción de ácido D-Láctico | Crecimiento a 15°C | Crecimiento a 45°C | Oxidasa | Arabinosa | Celobiosa | Fucosa | Galactosa | Melezitosa | |
| (-) | (+) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (+) | (=) | |
| Salicina | Fructosa | Hialuronidasa | Coagulasa | Fibrinolisisina | DNasa | TNasa | Arginina dehidrolasa | | |
| (-) | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) | (-) | (=) | | |
| Glucoronidasa | Galactosidasa | Resistencia a Novobiocina | | Glucosidasa | Producción de acetoina | Manosa | Ribosa | Clumping factor | |
| (-) | (-) | (=) | | = | (-) | (+) | (+) | (=) | |

Tabla 10. Características culturales y bioquímicas de *Staphylococcus haemolyticus*

| Staphylococcus haemolyticus | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------------|----------------------------------|-----------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|------------|
| Hemólisis | Pigmento carotenóide | Diámetro de la colonia>5mm (48h) | | Crecimiento aeróbico | Crecimiento ananeróbico | lactosa | Trealosa | Manitol | Xilitol |
| (+) | (=) | (+) | | (+) | (+) | (=) | (+) | (=) | (-) |
| Reducción de nitrato | Fosfatasa alcalina | Rafinosa | Xilosa | Sacarosa | Ureasa | Crecimiento en NaCl 10% | Crecimiento en NaCl 15% | Producción de ácido L-Láctico | |
| (=) | (-) | (-) | (-) | (+) | (-) | (+) | (=) | (+) | |
| Producción de ácido D-Láctico | Crecimiento a 15°C | Crecimiento a 45°C | | Oxidasa | Arabinosa | Celobiosa | Fucosa | Galactosa | Melezitosa |
| (-) | (-) | (+) | | (-) | (-) | (-) | (-) | (=) | (-) |
| Salicina | Fructosa | Hialuronidasa | Coagulasa | Fibrinolisisina | DNasa | TNasa | Arginina dehidrolasa | | |
| (-) | (=) | (X) | (-) | (X) | (=) | (-) | (+) | | |
| Glucoronidasa | Galactosidasa | Resistencia a Novobiocina | | Glucosidasa | Producción de acetoina | Manosa | Ribosa | Clumping factor | |
| (=) | (-) | (=) | | = | (=) | (-) | (=) | (=) | |

Tabla 11. Características culturales y bioquímicas de *Staphylococcus xylosus*

| Staphylococcus xylosus | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------|
| Hemolisis | Pigmento carotenoides | Diámetro de la colonia>5mm (48h) | | Crecimiento aeróbico | Crecimiento ananeróbico | lactosa | Trealosa | Manitol | Xilitol |
| (-) | (=) | (+) | | (+) | (=) | (=) | (+) | (=) | (-) |
| Reducción de nitrato | Fosfatasa alcalina | Rafinosa | Xilosa | Sacarosa | Ureasa | Crecimiento en NaCl 10% | Crecimiento en NaCl 15% | Producción de ácido L-Láctico | |
| (=) | (=) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (=) | (X) | |
| Producción de ácido D-Láctico | Crecimiento a 15°C | Crecimiento a 45°C | Oxidasa | Arabinosa | Celobiosa | Fucosa | Galactosa | Melezitosa | |
| (-) | (+) | (-) | (-) | (+) | (-) | (-) | (=) | (=) | |
| Salicina | Fructosa | Hialuronidasa | Coagulasa | Fibrinolisisina | DNasa | TNasa | Arginina dehidrolasa | | |
| (=) | (+) | (+) | (-) | (=) | (-) | (-) | (=) | | |
| Glucoronidasa | Galactosidasa | Resistencia a Novobiocina | | Glucosidasa | Producción de acetoina | Manosa | Ribosa | Clumping factor | |
| (=) | (+) | (+) | | (+) | (=) | (+) | (=) | (=) | |

Tabla 12. Características culturales y bioquímicas de *Staphylococcus warneri*

| Staphylococcus warneri | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------|-------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-----------|-------------------------------|-----------------|
| Hemolisis | Pigmento carotenoides | Diámetro de la colonia>5mm (48h) | | Crecimiento aeróbico | | Crecimiento ananeróbico | | lactosa | Trealosa | Manitol | Xilitol |
| (=) | (=) | (=) | | (+) | | (+) | | (=) | (+) | (=) | (-) |
| Reducción de nitrato | Fosfatasa alcalina | Rafinosa | Xilosa | Sacarosa | Ureasa | Crecimiento en NaCl 10% | | Crecimiento en NaCl 15% | | Producción de ácido L-Láctico | |
| (-) | (-) | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | | (X) | | (+) | |
| Producción de ácido D-Láctico | Crecimiento a 15°C | | Crecimiento a 45°C | | Oxidasa | Arabinosa | Celobiosa | Fucosa | Galactosa | Melezitosa | |
| (+) | (=) | | (+) | | (-) | (-) | (-) | (-) | (=) | (=) | |
| Salicina | Fructosa | Hialuronidasa | | Coagulasa | | Fibrinolisis | | DNasa | TNasa | Arginina dehidrolasa | |
| (-) | (+) | (X) | | (=) | | (X) | | (=) | (-) | (=) | |
| Glucoronidasa | Galactosidasa | | Resistencia a Novobiocina | | Glucosidasa | | Producción de acetoina | | Manosa | Ribosa | Clumping factor |
| (=) | (=) | | (=) | | (+) | | (+) | | (-) | (=) | (-) |

Tabla 13. Características culturales y bioquímicas de *Staphylococcus simulans*

| Staphylococcus simulans | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------|--|
| Hemolisis | Pigmento carotenoides | Diámetro de la colonia>5mm (48h) | | Crecimiento aeróbico | Crecimiento ananeróbico | Lactosa | Trealosa | Manitol | Xilitol | |
| (-) | (-) | (=) | | (+) | (+) | (+) | (=) | (+) | (=) | |
| Reducción de nitrato | Fosfatasa alcalina | Rafinosa | Xilosa | Sacarosa | Ureasa | Crecimiento en NaCl 10% | Crecimiento en NaCl 15% | Producción de ácido L-Láctico | | |
| (+) | (-) | (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (X) | (=) | | |
| Producción de ácido D-Láctico | Crecimiento a 15°C | Crecimiento a 45°C | Oxidasa | Arabinosa | Celobiosa | Fucosa | Galactosa | Melezitosa | | |
| (=) | (+) | (+) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (=) | | |
| Salicina | Fructosa | Hialuronidasa | Coagulasa | Fibrinolisis | DNasa | TNasa | Arginina dehidrolasa | | | |
| (-) | (+) | (X) | (-) | (X) | (X) | (-) | (=) | | | |
| Glucuronidasa | Galactosidasa | Resistencia a Novobiocina | | Glucosidasa | Producción de acetoina | Manosa | Ribosa | Clumping factor | | |
| (=) | (+) | (=) | | (-) | (-) | (=) | (=) | (=) | | |

Tabla 14. Características culturales y bioquímicas de *Staphylococcus epidermidis*

| Staphylococcus epidermidis | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------|----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|------------|---------|
| Hemolisis | Pigmento carotenoides | Diámetro de la colonia >5mm (48h) | | Crecimiento aeróbico | | Crecimiento ananeróbico | Lactosa | Trealosa | Manitol | Xilitol |
| (-) | (-) | (-) | | (+) | | (+) | (=) | (-) | (+) | (-) |
| Reducción de nitrato | Fosfatasa alcalina | Rafinosa | Xilosa | Sacarosa | Ureasa | Crecimiento en NaCl 10% | Crecimiento en NaCl 15% | Producción de ácido L-Láctico | | |
| (+) | (+) | (-) | (X) | (+) | (+) | (=) | (-) | (X) | | |
| Producción de ácido D-Láctico | Crecimiento a 15°C | Crecimiento a 45°C | | Oxidasa | Arabinosa | Celobiosa | Fucosa | Galactosa | Melezitosa | |
| (X) | (-) | (+) | | (-) | (-) | (-) | (-) | (=) | (=) | |
| Salicina | Fructosa | Hialuronidasa | Coagulasa | Turanosa | DNasa | TNasa | Arginina dehidrolasa | | | |
| (-) | (X) | (=) | (-) | (=) | (-) | (-) | (+) | | | |
| Glucuronidasa | Galactosidasa | Resistencia a Novobiocina | | Glucosidasa | Producción de acetoina | Manosa | Ribosa | Clumping factor | | |
| (=) | (-) | (-) | | (=) | (+) | (+) | (=) | (-) | | |

Tabla 15. Características culturales y bioquímicas de *Staphylococcus capitis*

| Staphylococcus capitis | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------|
| Hemolisis | Pigmento carotenoides | Diámetro de la colonia>5mm (48h) | | Crecimiento aeróbico | Crecimiento ananeróbico | lactosa | Trealosa | Manitol | Xilitol |
| (=) | (=) | (=) | | (+) | (+) | (=) | (-) | (+) | (-) |
| Reducción de nitrato | Fosfatasa alcalina | Rafinosa | Xilosa | Sacarosa | Ureasa | Crecimiento en NaCl 10% | Crecimiento en NaCl 15% | Producción de ácido L-Láctico | |
| (=) | (-) | (-) | (-) | (+) | (+) | (X) | (X) | (X) | |
| Producción de ácido D-Láctico | Crecimiento a 15°C | Crecimiento a 45°C | Oxidasa | Arabinosa | Celobiosa | Turanosa | Galactosa | Melezitosa | |
| (X) | (x) | (X) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (X) | |
| Salicina | Fructosa | Hialuronidasa | Coagulasa | Fibrinolisis | DNasa | TNasa | Arginina dehidrolasa | | |
| (-) | (+) | (x) | (-) | (X) | = | (-) | = | | |
| Glucuronidasa | Galactosidasa | Resistencia a Novobiocina | | Glucosidasa | Producción de acetoina | Manosa | Ribosa | Clumping factor | |
| (X) | (X) | (X) | | (-) | (=) | (+) | (X) | (X) | |

Tabla 16. Características culturales y bioquímicas de *Staphylococcus hyicus*

| Staphylococcus hyicus | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|----------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|--|
| Hemolisis | Pigmento carotenoides | Diámetro de la colonia>5mm (48h) | Crecimiento aeróbico | Crecimiento ananeróbico | lactosa | Trealosa | Manitol | Xilitol | |
| (-) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) | (-) | |
| Reducción de nitrato | Fosfatasa alcalina | Rafinosa | Xilosa | Sacarosa | Ureasa | Crecimiento en NaCl 10% | Crecimiento en NaCl 15% | Producción de ácido L-Láctico | |
| (+) | (+) | (-) | (-) | (+) | (=) | (+) | (-) | (+) | |
| Producción de ácido D-Láctico | Crecimiento a 15°C | Crecimiento a 45°C | Oxidasa | Arabinosa | Celobiosa | Fucosa | Galactosa | Melezitosa | |
| (-) | (+) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (+) | (-) | |
| Salicina | Fructosa | Hialuronidasa | Coagulasa | Fibrinolisis | DNasa | TNasa | Arginina dehidrolasa | | |
| (-) | (+) | (+) | (=) | (=) | (+) | (+) | (+) | | |
| Glucuronidasa | Galactosidasa | Resistencia a Novobiocina | Glucosidasa | Producción de acetoina | Manosa | Ribosa | Clumping factor | | |
| (=) | (-) | (-) | (=) | (-) | (+) | (+) | (-) | | |

Referencias:(+) resultado positivo para la característica fisiológica o prueba bioquímica determinada; (-) resultado negativo; (=) resultado variable; (X) característica fisiológica o prueba bioquímica no determinada.

A los cocos coagulasa negativos se les realizó la siguiente prueba para diferenciarlos del género *Micrococcus*:

3.2.2.1. Sensibilidad a la furazolidona

Se preparó una suspensión de microorganismos en agua destilada estéril con una turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de McFarland. Con un hisopo embebido en dicha suspensión, se sembró una placa con Agar Muller Hinton realizando estrías en todas las direcciones, con el fin de cubrirla completamente, y de forma aséptica se colocó un disco de furazolidona en el centro del área sembrada. Luego se incubó 24 h a 37 °C. Aquellas cepas que mostraron zonas de inhibición de crecimiento fueron interpretadas como susceptibles e identificadas como *Staphylococcus* coagulasa negativos (Usó y col., 2003). Las cepas que desarrollaron crecimiento confluyente fueron identificadas como *Micrococcus* spp (Figura 14, a y b).

Las pruebas utilizadas en el esquema simple diseñado en este trabajo se desarrollan a continuación:

3.2.2.2. Prueba de la novobiocina

Se sembró con un hisopo embebido en una suspensión equivalente a la escala 0.5 de Mc Farland, una placa con Agar Muller Hinton y de forma aséptica se colocó un disco de novobiocina en el centro del área sembrada. Luego de incubar 24 hs a 37°C, se midió el halo de inhibición. Las especies que presentaron halos de

inhibición entre 6 y 12 mm fueron consideradas como resistentes, mientras que aquellas que presentaron halos de 16 mm o más, se las consideró sensibles (Figura 14 a y b).

3.2.2.3. Producción de fosfatasa alcalina

La actividad de fosfatasa se detectó utilizando agar P conteniendo 0.495 mg de para-nitrofenilfosfato de amonio por ml [Lee, J. C. 1998]. En una placa conteniendo este medio se sembraron en spots varias cepas. Después de 24-48 hs de incubación a 37°C, la aparición de un halo color amarillo alrededor del crecimiento indicó actividad fosfatasa (Figura 14 e).

3.2.2.4. Producción de hemolisinas

La producción de alfa y beta hemolisinas se determinó en placas de Agar Sangre de Carnero al 5% luego de 24 hs de incubación a 37°C y de 12-24 hs a 4°C (Figura 14 c).

3.2.2.5. Producción de pigmentos

Se sembró una placa conteniendo agar P con el microorganismo a estudiar y se lo incubaron 24 hs a 37°C. Las colonias pigmentadas se vieron de un color que va desde el naranja-dorado al amarillo pálido (Figura 14 d).

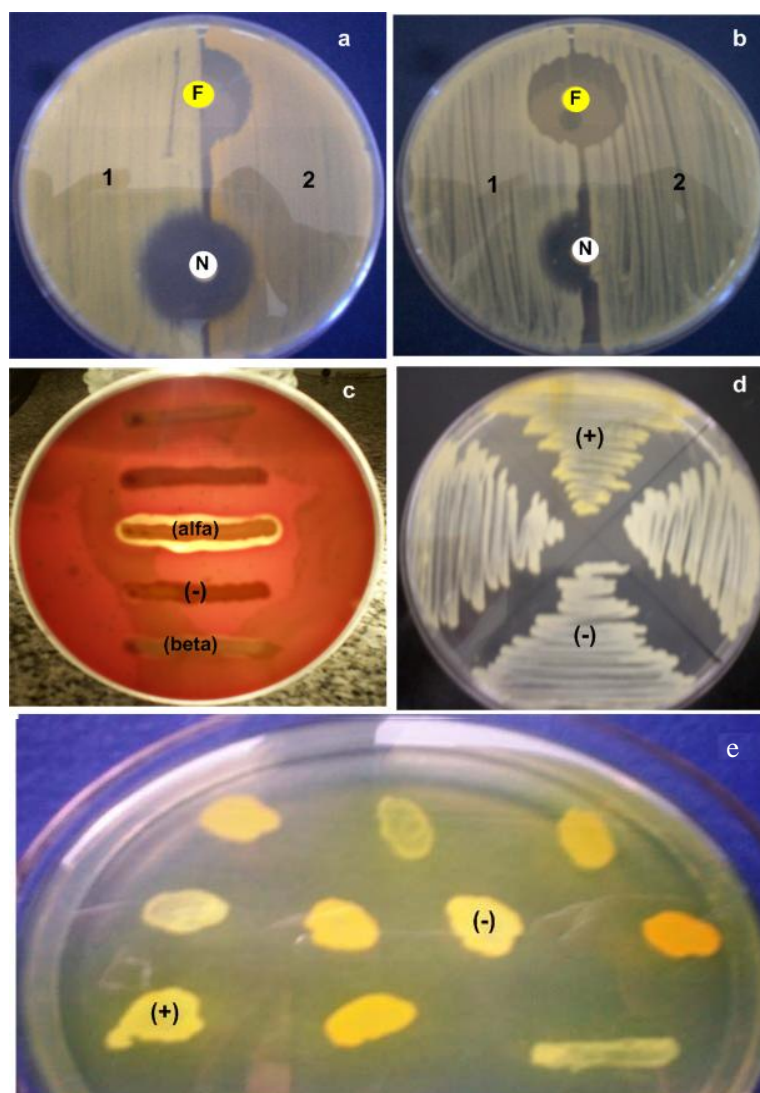


Figura 14. a) Prueba de la Furazolidona (a1 resistente - a2 sensible) y Novobiocina (a1 sensible – a2 sensible), b) Prueba de la Furazolidona (b1 sensible – b2 sensible) y Novobiocina (b1 sensible – b2 resistente) c) Actividad hemolítica, d) Producción de pigmento, e) Producción de la fosfatasa

3.2.2.6. Utilización aeróbica de xilosa

Se sembró por picadura, un tubo con medio base OF con el agregado de distintos azúcares al 1%. Se incubó durante 24-48 hs a 37°C. El viraje del medio de amarillo a azul verdoso indicó reacción positiva (Figura 15 a).

3.2.2.7. Producción de ureasa

Se sembró una ansada de un cultivo puro del microorganismo en medio de cultivo para Ureasa. Se incubó a 35°C durante 24 hs. La aparición de un color rosado a fucsina en todo el medio indica alcalinización e hidrólisis de la urea (Figura 15 b).

3.2.2.8. Producción de acetoína (Voges-Proskauer)

Se inoculó un tubo conteniendo 2 ml de caldo RM/VP con una ansada de un cultivo puro del microorganismo. Se incubó durante 24 hs a 37°C. Posteriormente, se tomó 1 ml del cultivo y se le agregó 0.6 ml de α -naftol al 5% seguido de 0.2 ml de KOH al 40%. Se agitó suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y se lo dejó reposar durante 30 min. La presencia de color rojo dentro de los 30 min de exposición al aire se consideró positivo (Figura 15 c).

3.2.2.9. Prueba de DNAsa

En el medio de cultivo, la triptefina es la fuente de nitrógeno, aminoácidos, y aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano. El ácido desoxirribonucleico (ADN), se encuentra en grado altamente polimerizado, y es el sustrato de la enzima desoxirribonucleasa (DNAsa), la cual lo hidroliza. La presencia de la enzima, se puede detectar mediante el agregado de ácido clorhídrico 1N. Siembra. A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, se sembró un inóculo denso, ya sea en estría o por la técnica de spot. Incubación: En aerobiosis, durante 24-48 hs a 35-37°C. Cubrir la placa con ácido clorhídrico 1N, y observar

dentro de los primeros 5 min. Lectura Positivo: halo claro, transparente alrededor del crecimiento bacteriano (Figura 16). Negativo: el medio se observa opaco.

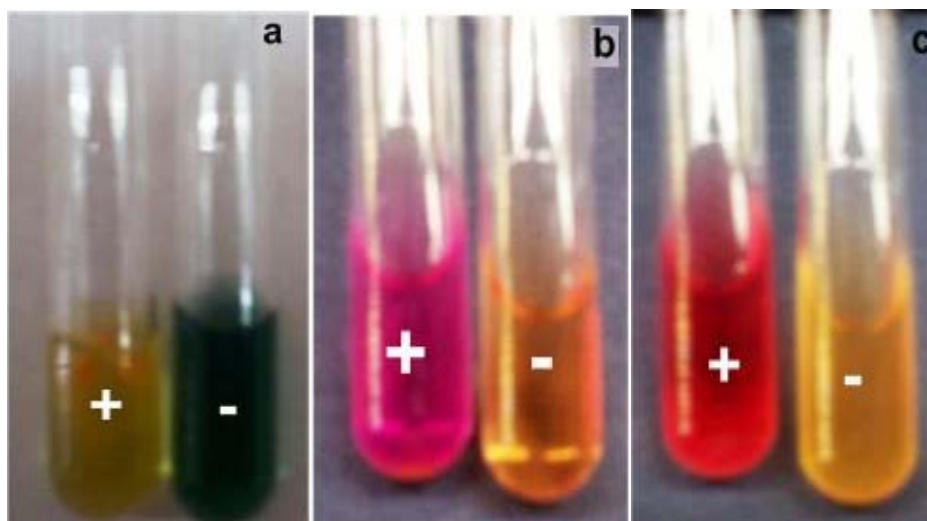


Figura 15. a) Prueba de la Utilización de Azúcares, b) Prueba de la Urea, c) Prueba de la Acetoína.



Figura 16. Prueba de DNasa

3.2.3. Detección de factores de virulencia: lipasas, sinergismo de hemolisis y proteasas

3.2.3.1. Prueba de actividad de lipasas

Los estafilococos que contienen lecitinasas rompen la yema de huevo y forman zonas claras alrededor de las colonias. Zonas opacas de precipitación se pueden formar debido a la actividad de las lipasas (Figura 17).



Figura 17. Prueba de lipasa en medio Baird-Parker suplementado con yema de huevo.

3.2.3.2. Prueba del sinergismo de hemólisis

Se realizó la técnica de Hébert y Hancock, (1985) utilizando una conocida cepa de *S. aureus* productora de β -lisina (cepa RN6390). La cepa de *S. aureus* fue sembrada desde la parte superior hasta la parte inferior de la placa de agar sangre. Las cepas de SCN se sembraron en estrías perpendiculares, pero sin tocar, la línea central de la cepa β -hemolítica. De 8 a 10 cepas de SCN fueron probadas en cada placa. Las placas se incubaron aeróbicamente a 35°C durante 24 hs. Se consideró

resultado positivo una zona de hemólisis completa dentro de la zona de hemólisis incompleta producida por *S. aureus* (Figura 18).

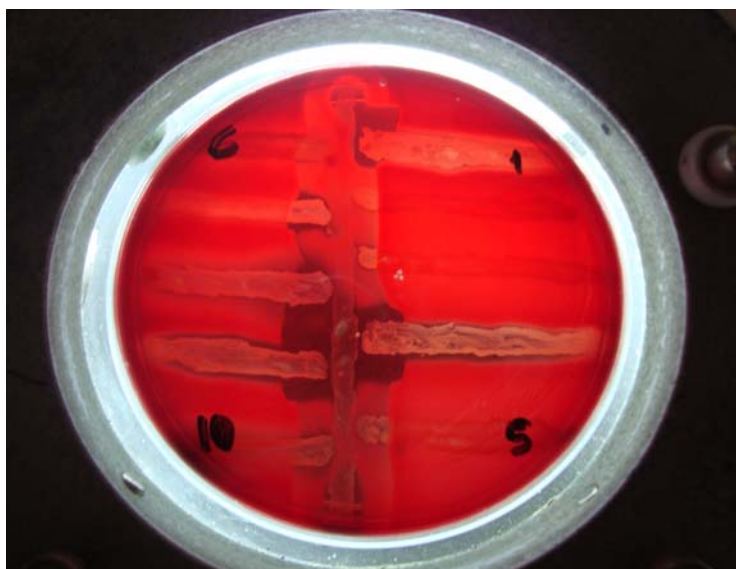


Figura 18. Prueba de actividad del sinergismo de hemólisis

3.2.3.3. Prueba de actividad de proteasas

La actividad proteolítica se detectó por siembra en placa de Petri, con ansa en anillo en forma puntual (spot) sobre placas de agar leche al 2% y posterior lectura a las 24 hs de incubación a 37°C. La presencia de un halo transparente alrededor de la siembra fue considerado como evidencia de actividad de proteasa (Figura 19).



Figura 19. Prueba de proteasa.

3.2.4. Formación de biofilm en placas de micro titulación (prueba cuantitativa).

Se han utilizado muchos métodos para la detección de la producción de biofilm para cepas de SCN. Entre los más frecuentemente empleados se encuentran los de Christensen (1985) el método en tubo y el método espectrofotométrico, de los cuales el principal inconveniente del primero es su naturaleza cualitativa, mientras que el segundo resulta incompleto ya que solamente detecta la formación de biofilms en la parte inferior de los pocillos de la policubeta [Stepanović y col., 2000]. El ensayo en placa con agar Rojo Congo [Freeman y col., 1989] posee la ventaja de sencillez de realización, aunque la interpretación es subjetiva dado su naturaleza cualitativa.

La prueba en placa de micro titulación es la técnica más utilizada para la cuantificación de la formación de biofilm [Stepanović y col. 2000, Stepanović y col. 2007]. A partir de un cultivo puro en placa se preparó una suspensión bacteriana en TSB hasta una opacidad del 0,5 de la escala de Mac Farland y se cultivó durante 16 hs a 37°C. Posteriormente, una alícuota de 100µl del cultivo se colocó en dos pocillos adyacente (siembra por duplicado) y luego se agregaron 200µl de TSB suplementado con glucosa al 1% a cada pocillo de la microplaca de ELISA. A su vez se inoculó como control negativo 300µl de TSB también suplementado con el azúcar. Tras la incubación a 37°C por 24 hs, se removió el contenido y cada pocillo se lavó tres veces con 250µl de una solución de PBS pH 7.6. Posteriormente, se fijó el biofilm producido llenando cada pocillo con 200µl de metanol al 99% y se dejaron reposar por 15 min a temperatura ambiente para después vaciar los pocillos y dejarlos secar colocando la placa de microtitulación en estufa a 37°C. Una vez

secos, cada pocillo fue teñido con 200µl de cristal violeta de Hucker al 2%, después de 5 min se descartó el colorante, se procedió al lavado de las policubetas con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente. El material adherido a las paredes de los pocillos fue resolubilizado con 160µl de ácido acético glacial al 33% y la densidad óptica (DO) fue leída a 550 nm en un lector de microplacas (Labsystems Multiskan M.S.) (Figura 20). Como blanco o testigo, se utilizó medio de cultivo con adición de glucosa y sin inocular, y como control positivo una cepa de referencia, *S. aureus* ATCC 25923. Los ensayos se realizaron por duplicado para las cepas ensayadas, para el blanco y el control positivo.

La DO de cada muestra (DO_m) se obtuvo por la media aritmética de la absorbancia de dos pocillos y este valor se comparó con la media de la absorbancia de los controles negativos (DO_{cn}). La siguiente clasificación, según Rodrigues y col., (2010), se utilizó para la determinación de la formación de biofilms: sin producción de biofilm ($DO_m \leq DO_{cn}$), producción de biofilm débil ($DO_{cn} < DO_m \leq 2 \cdot DO_{cn}$) y producción de biofilm fuerte ($4 \cdot DO_{cn} < DO_m$).

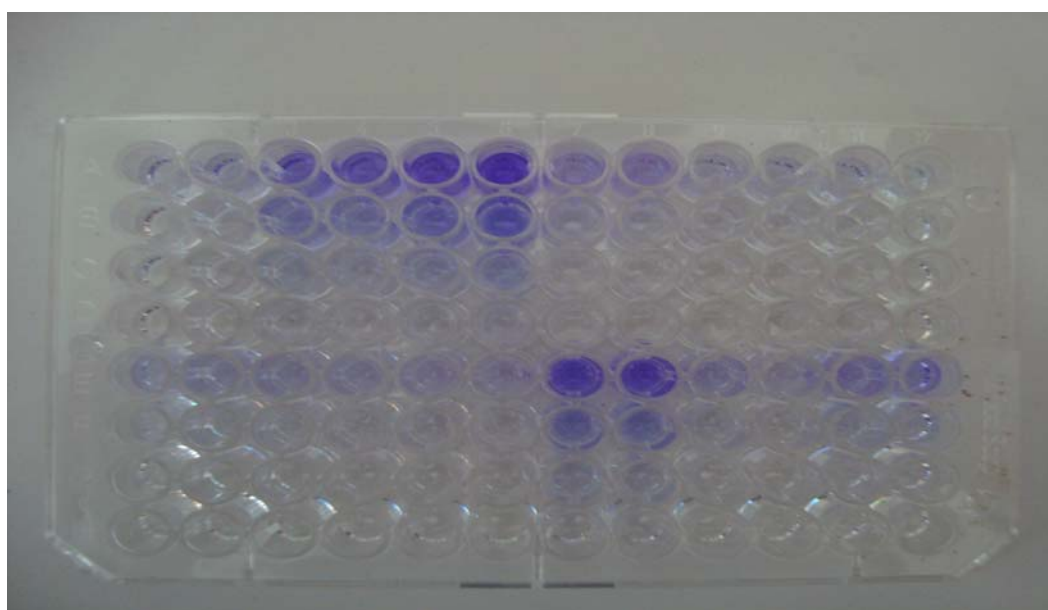


Figura 20. Placa de micro titulación de biofilm

3.2.5. Ensayos de PCR para la detección de los genes del operón *icaADBC*, *bap* y *eno*.

La extracción de ADN cromosomal a partir de los aislamientos de SCN se realizó según lo descrito previamente (3.2.1.1). La PCR se efectuó en un Termociclador PTC-220 (MJ Research Inc.) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la amplificación de los genes asociados a biofilm se utilizaron los cebadores citados por la bibliografía [Vasudeman y col., 2003; Seo y col., 2008; Vautor y col., 2008; Hussain, 2011; Simojoki y col., 2012] (Tabla 6). Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l en tubos de PCR de 0,2 ml. Las soluciones stock, la concentración final de cada componente de la MIX de PCR y los ciclos de cada programa de amplificación usados para amplificar los diferentes genes se detallan en las Tablas 17-19. Además del control negativo que consiste en preparar un tubo extra al que se le agregaron todos los reactivos utilizados en el PCR, excepto ADN para poder visualizar posibles casos de contaminación se incluyeron las cepas de referencia como control positivo.

Tabla 17. Mezcla de reacción y programa de PCR para la amplificación de los genes *icaA*, *icaB* e *icaD*

| Soluciones y reactivos stock | MIX 1X (Volumen) | MIX 1X (Concentración final) | Programa de amplificación |
|---|---------------------|---------------------------------|--|
| Buffer green, 5X | 10 μ l | 1X | 1) Desnaturalización inicial a 95°C 2 min 2) 30 ciclos de amplificación: Desnaturalización a 92°C 45 seg Hibridación a 49°C 45 seg Extensión a 72°C 1 min 3) Extensión final a 72°C 7 min |
| Cebador directo " <i>forward primer</i> ", 40 μ M | 1,25 μ l | 1 μ M | |
| Cebador inverso " <i>reverse primer</i> ", 40 μ M | 1,25 μ l | 1 μ M | |
| dNTPs, 25mM de c/u | 0,5 μ l | 250 μ M de c/u | |
| MgCl ₂ , 25 mM | 5 μ l | 2.5 mM | |
| Taq, 5U/ μ l | 0,25 μ l | 1,25 U | |
| H ₂ O para PCR | 26,75 μ l | | |
| ADN | 5 μ l | | |
| Volumen final | 50 μ l | | |

Tabla 18. Mezcla de reacción y programa de PCR para la amplificación del gen *bap*

| Soluciones y reactivos stock | MIX 1X (Volumen) | MIX 1X (Concentración final) | Programa de amplificación |
|---|---------------------|---------------------------------|--|
| Buffer green, 5X | 10 μ l | 1X | 1) Desnaturalización inicial a 95°C 2 min 2) 35 ciclos de amplificación: Desnaturalización a 94°C 1 min Hibridación a 42°C 1min Extensión a 72°C 50 seg 3) Extensión final a 72°C 5 min |
| Cebador directo " <i>forward primer</i> ", 25 μ M | 2 μ l | 1 μ M | |
| Cebador inverso " <i>reverse primer</i> ", 25 μ M | 2 μ l | 1 μ M | |
| dNTPs, 25mM de c/u | 0,5 μ l | 250 μ M de c/u | |
| MgCl ₂ , 25 mM | 3 μ l | 1,5 mM | |
| Taq, 5U/ μ l | 0,3 μ l | 1,5 U | |
| H ₂ O libre de nucleasas | 27,2 μ l | | |
| ADN | 5 μ l | | |
| Volumen final | 50 μ l | | |

Tabla 19. Mezcla de reacción y programa de PCR para la amplificación del gen *eno*

| Soluciones y reactivos stock | MIX 1X (Volumen) | MIX 1X (Concentración final) | Programa de amplificación |
|---|---------------------|---------------------------------|--|
| Buffer green, 5X | 10 μ l | 1X | 1) Desnaturalización inicial a 94°C 5 min 2) 30 ciclos de amplificación: Desnaturalización a 94°C 1min Hibridación a 55°C 1min Extensión a 72°C 1 min 3) Extensión final a 72°C 5 min |
| Cebador directo " <i>forward primer</i> ", 25 μ M | 1 μ l | 12,5 pmoles | |
| Cebador inverso " <i>reverse primer</i> ", 25 μ M | 1 μ l | 12,5 pmoles | |
| dNTPs, 25mM de c/u | 0,5 μ l | 250 μ M de c/u | |
| MgCl ₂ , 25 mM | 3 μ l | 1,5 mM | |
| Taq, 5U/ μ l | 0,4 μ l | 2 U | |
| H ₂ O para PCR | 29,1 μ l | | |
| ADN | 5 μ l | | |
| Volumen final | 50 μ l | | |

3.2.6. Prueba de sensibilidad a antibióticos por determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) Trek Diagnostic Systems

Las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos “in vitro” se llevaron a cabo mediante el método de la microdilución (Concentración Inhibitoria Mínima, CIM). Se utilizó un panel de antibióticos en distintas diluciones fijados a una matriz plástica de 96 pocillos (Trek Diagnostic Systems, Magellan Biosciences, Reino Unido-EE.UU.) (Sensititre®-MEDICA-TEC) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los antimicrobianos y los rangos de diluciones probadas en este estudio fueron: penicilina (0,06-8 µg/ml), oxacilina (0,25-4 µg/ml), eritromicina (0,25-4 µg/ml), tetraciclina (2-16 µg/ml) y clindamicina (0,5-2 µg/ml). El inóculo fue preparado a partir de cultivos en crecimiento de fase logarítmica y estandarizado según el grado de turbidez en la escala de McFarland, para lograr una concentración final de aproximadamente 5×10^4 ufc/pocillo. Los paneles se incubaron a 35°C durante 20-24 hs. Los puntos de corte para las CIM e interpretación de las pruebas de sensibilidad “in vitro” se basaron en criterios interpretativos veterinarios del Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos [CLSI, 2008] documento M31-A3. Para el control de calidad, se incluyó la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 en cada ensayo, según las recomendaciones del CLSI (2008). Los aislados del SNC se clasificaron como sensibles o no sensibles (incluyendo en estos últimos a los aislamientos “intermedios” y “resistentes”).

Lectura de los resultados: la proliferación apareció como turbidez y la no proliferación como un depósito de células en el fondo del pocillo. La CIM se registró como la concentración inhibitoria mínima de antibióticos que inhibió la proliferación visible de los microorganismos (Figura 21).

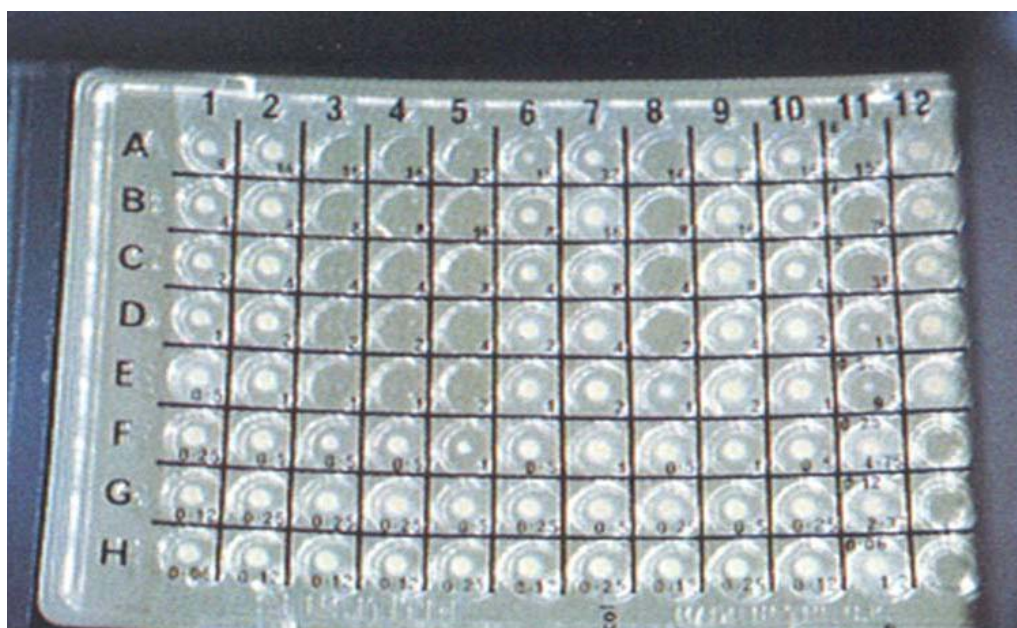


Figura 21. Policubetas (Sin proliferación = sensible; Proliferación = Resistente)

Es importante aclarar que la oxacilina se incluyó para la detección de las cepas meticilina resistentes (MR) debido a que es más estable que la meticilina y provee resultados más fidedignos.

3.2.7. Ensayos de PCR para la detección de genes asociados a la resistencia a β -lactámicos, *blaZ* y *mecA*

La extracción de ADN cromosomal a partir de los aislamientos de SCN se realizó según lo descrito previamente (3.2.1.1). La PCR se efectuó en un Termociclador PTC-220 (MJ Research Inc.) siguiendo las especificaciones del fabricante, con un volumen final de reacción de 50 μ l. Para la amplificación de los genes asociados a la resistencia a β -lactámicos se utilizaron los cebadores citados por la bibliografía [Sawant y col., 2009; Soares y col., 2012] (Tabla 7). La concentración final y el volumen de cada uno de los reactivos y soluciones que

componen la mezcla de reacción para amplificar los genes *blaZ* y *mecA*, se detallan en la Tabla 20.

Tabla 20. Mezcla de reacción y programa de PCR para la amplificación de los genes *blaZ* y *mecA*

| Soluciones y reactivos stock | MIX 1X (Volumen) | MIX 1X (Concentración final) | Programa de amplificación |
|---|---------------------|---------------------------------|--|
| Buffer green, 5X | 10 μ l | 1X | 1) Desnaturalización inicial a 95°C 4 min 2) 35 ciclos de amplificación: Desnaturalización a 95°C 30 seg Hibridación a 55°C 30 seg Extensión a 72°C 1 min 3) Extensión final a 72°C 8 min |
| Cebador directo " <i>forward primer</i> ", 25 μ M | 2 μ l | 1 μ M | |
| Cebador inverso " <i>reverse primer</i> ", 25 μ M | 2 μ l | 1 μ M | |
| dNTPs, 25mM de c/u | 0,4 μ l | 200 μ M de c/u | |
| MgCl ₂ , 25 mM | 3 μ l | 1,5 mM | |
| <i>Taq</i> polimerasa 5U/ μ l | 0,2 μ l | 1 U | |
| H ₂ O libre de nucleasas | 27,4 μ l | | |
| ADN | 5 μ l | | |
| Volumen final | 50 μ l | | |

En cada amplificación se incorporaron los controles negativo y positivo con el fin de chequear la pureza de los reactivos utilizados y las condiciones de reacción.

3.2.8. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos obtenidos de la reacción de PCR fueron corridos en geles de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X teñidos con 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio. Un volumen de 5 μ l de cada muestra fue sembrado en cada calle del gel. La corrida electroforética correspondiente a los productos de amplificación fue llevada a cabo durante 50 min a 75 V y el peso molecular de los productos amplificados se confirmó por comparación con un marcador de peso molecular (*Ladder* 1 Kb, Invitrogen). Los patrones de bandas fueron visualizados en un transiluminador con luz UV,

digitalizados en un digitalizador (Alpha Innotech Corporation), y almacenados en formato TIFF (Tagget Image Files Format) para su posterior análisis.

3.2.9. Conservación de cepas

Una ansada de cada cultivo puro de 24 hs a 37°C perteneciente a cada especie de SCN identificada fue homogeneizada en 1ml de TSB con glicerol al 20% estéril y conservada a -20°C.

4. RESULTADOS

4.1. Identificación a nivel de especie de *Staphylococcus* coagulasa negativos aislados a partir de leche bovina: PCR-RFLP del gen *groEL*.

Los métodos basados en la secuencia del ADN minimizan las dificultades encontradas en la clasificación de cepas de SCN por métodos fenotípicos [Gillespie y Oliver, 2005; Taponen y col., 2006]. Entre ellos el ensayo de PCR-RFLP del gen *groEL* permite una identificación correcta y reproducible de las diferentes especies de SCN de origen bovino [Santos y col. 2008].

4.1.1. Puesta a punto de la técnica de PCR-RFLP del gen *groEL* con cepas de referencia de SCN.

Para la puesta a punto de la técnica se emplearon las cepas de referencia descritas en materiales y métodos.

El tratamiento descrito por Aires de Souza y col. (1997) de unas pocas colonias con lisostafina y su posterior incubación a elevadas temperaturas, permitió la adecuada lisis celular. La cantidad de ADN cromosomal extraído pudo ser usado como templado en la reacción de amplificación por PCR. El par de cebadores H279A y H280A permitió amplificar con éxito, en las cepas de referencia, un fragmento de 550 pb correspondiente al gen *groEL* (Figura 22).

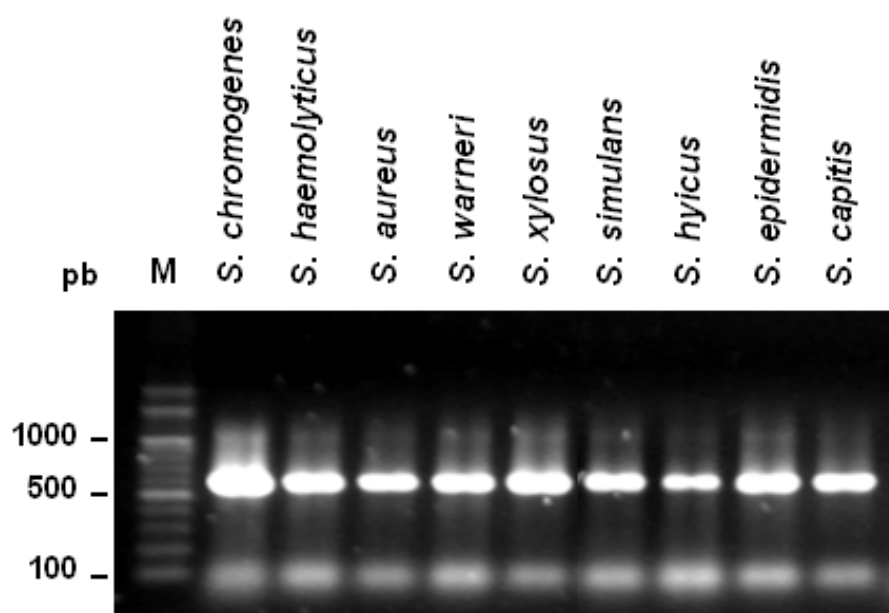


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR del gen *groEL* de 550-bp, a partir de cepas de referencia de *Staphylococcus* spp. utilizando los cebadores H279A y H280A. M: marcador de peso molecular de ADN 100 pb (Promega).

El amplicón de 550 pb de cada especie analizada fue digerido con la enzima de restricción *AluI* y se obtuvieron luego de la electroforesis en gel de agarosa al 3,5%, nueve patrones de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) específicos de especie, los cuales se correlacionaron con los obtenidos por otros investigadores [Barros y col., 2007; Santos y col., 2008]. (Figura 23). Cada patrón consistió de 2 a 4 fragmentos de ADN con un tamaño aproximado de 40 pb a 530 pb

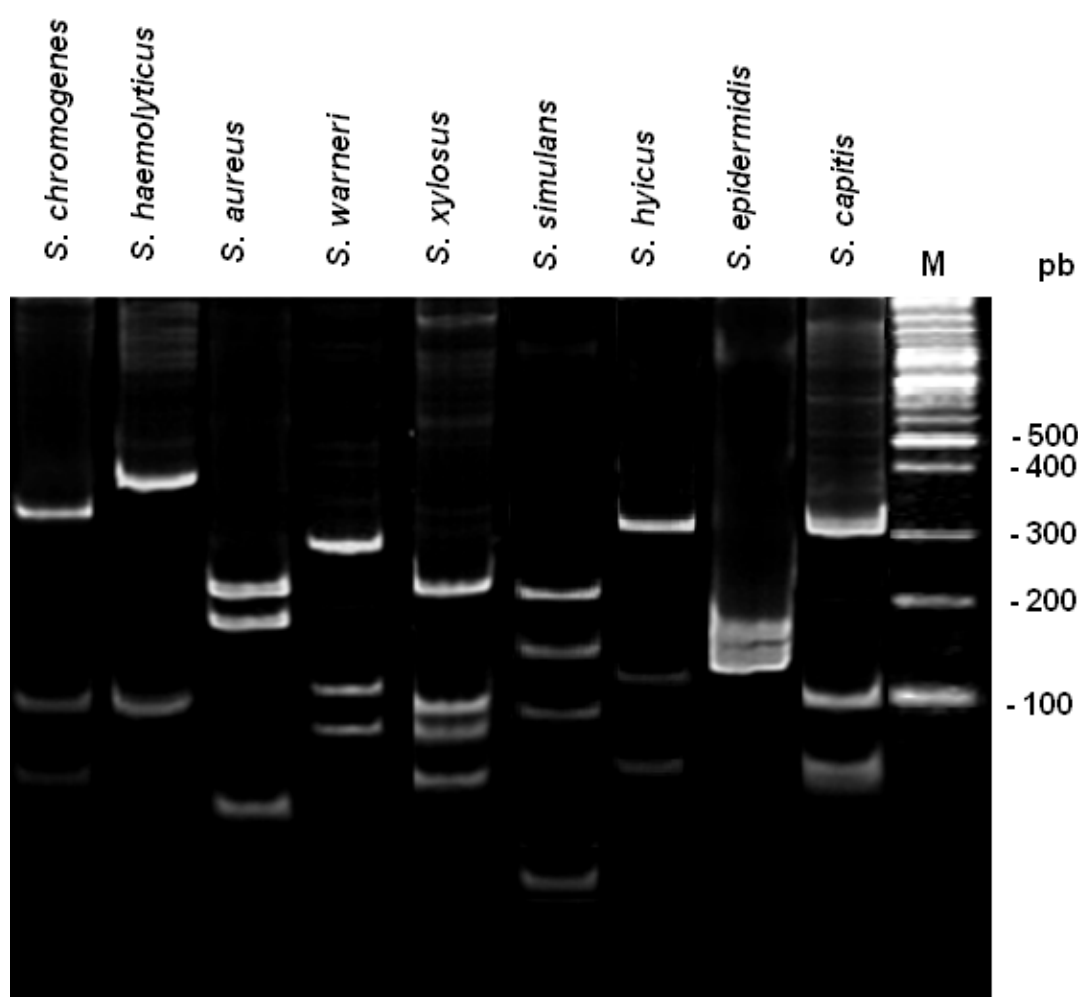


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 3,5% de los fragmentos generados por la digestión con *AluI* de los productos de amplificación por PCR a partir de *Staphylococcus spp.* M: marcador de peso molecular de ADN 100-pb.

Las especies *S. chromogenes*, *S. capitis* y *S. hyicus* presentaron patrones similares de RFLP (Figura 23). Para estas tres especies se llevó a cabo una doble digestión con *HindIII* y *PvuII* y claramente se distinguieron, al igual que lo descrito en la bibliografía [Santos y col., 2008], diferentes patrones de RFLP (Figura 24).

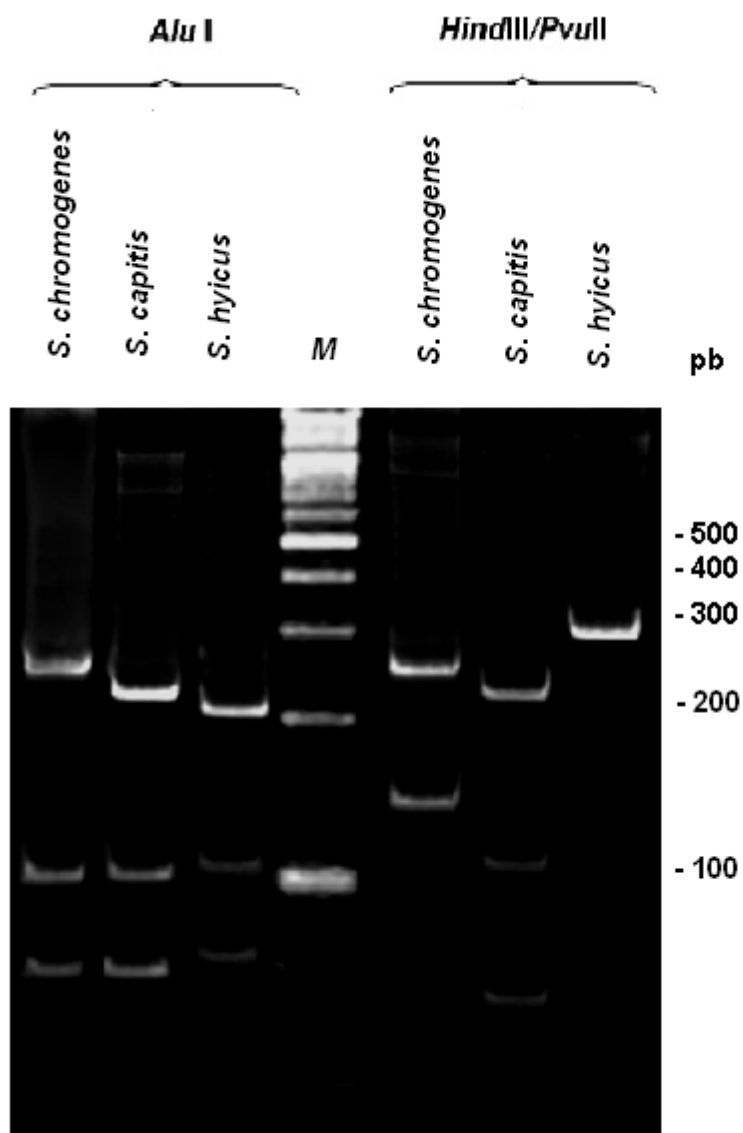


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 3,5% de los fragmentos generados por la digestión con *AluI* y *HindIII/PvuII*, a partir de los productos de amplificación por PCR del gen *groEL*. *S. chromogenes*, *S. capitis* y *S. hyicus*. M: marcador de peso molecular de ADN 100-pb.

Finalizada la puesta a punto del método de identificación genotípico con las cepas de referencia se procedió a analizar las cepas de SCN aisladas de leches de origen bovino.

4.1.2. Frecuencia de aislamiento de especies de SCN identificadas genotípicamente por PCR-RFLP del gen *groEL*

El par de cebadores H279A y H280A permitió amplificar satisfactoriamente el fragmento esperado de 550 pb del gen *groEL* en 302 aislamientos de SCN de origen bovino, que representan el 32% (302/943) del total de SCN aislados puros a partir de 51 tambos de la cuenca lechera de Villa María, las cuales fueron identificadas previamente a nivel de especie por una marcha bacteriológica convencional y por el sistema de identificación comercial *Staph-Zym*TM [Oddi, 2008; Magnano, 2009; Bello; 2009; Dieser y col., 2009, Bonetto, 2010]

La digestión con enzimas de restricción del ADN amplificado de los SCN en estudio, permitió organizar a las cepas en ocho patrones de restricción específicos. La Figura 25 muestra la frecuencia de aislamiento entre los SCN identificados, donde las dos especies más frecuentemente aisladas fueron *S. chromogenes* y *S. haemolyticus*.

En este estudio, de tres a cinco especies de SCN estuvieron presentes en el 62,7% de los tambos en diferentes combinaciones. *S. chromogenes* se aisló en la mayoría (90,2%) de todos los establecimientos lecheros, mientras que *S. haemolyticus* se aisló en el 88,2% de ellos. Las especies del SCN más raramente aislados estuvieron restringidas a unos pocos tambos.

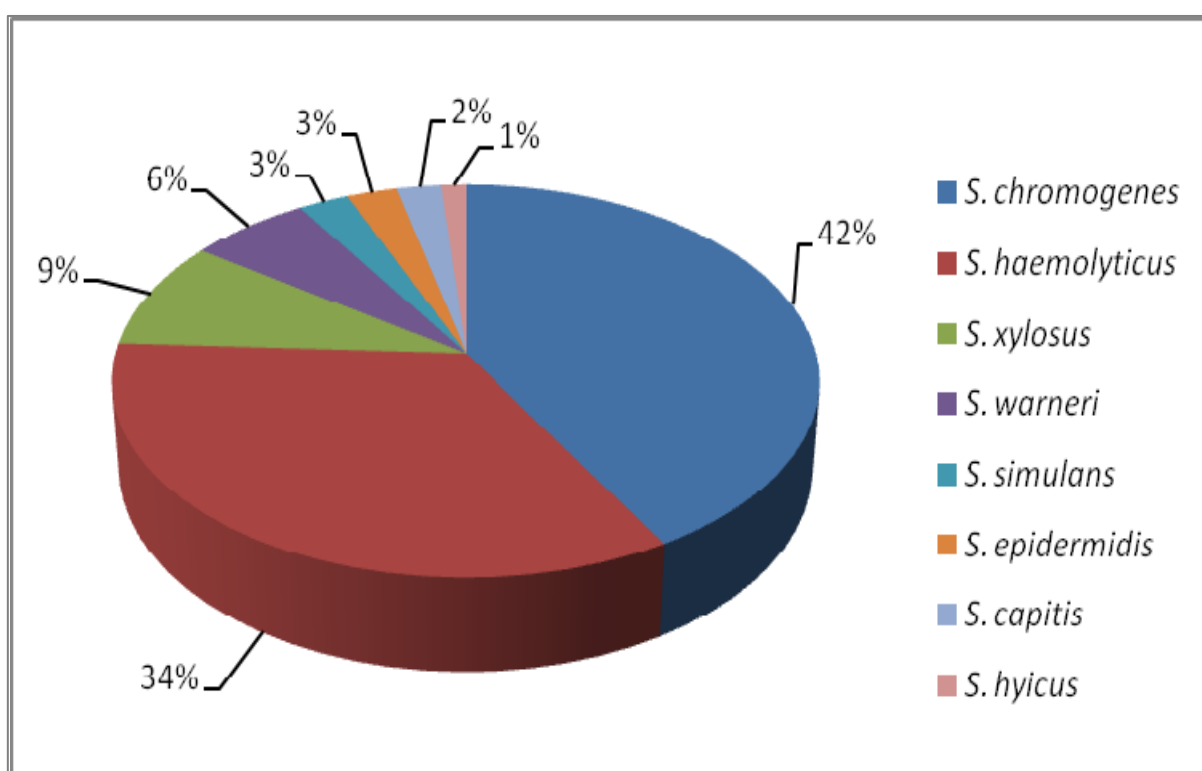


Figura 25. Frecuencia relativa de especies de SCN aisladas de 51 tampos de la cuenca lechera de Villa María, identificados por PCR-RFLP del gen *groEL*.

4.1.3. Comparación del método molecular PCR-RFLP del gen *groEL* con dos metodologías fenotípicas para la identificación de especies de SCN aisladas de leches bovinas.

Con los resultados obtenidos en este trabajo y considerando a la identificación genotípica de especie como la metodología más sensible y específica [Heikens y col, 2005; Zadoks y Watts 2009; Capurro y col., 2009; Park y col., 2011; Geraghty y col 2013], se hizo un análisis comparativo con los resultados de un trabajo previo de identificación fenotípica de las misma cepas [Dieser ycol., 2009; Bonetto, 2010].

Como lo muestra la Tabla 21 la identificación de especies obtenida del desarrollo de una marcha bacteriológica convencional basada en la utilización de varios azúcares, producción de hemolisinas, reducción de nitrato, producción de ureasa y resistencia a novobiocina entre otras pruebas [Bonetto, 2010], se correspondió en un 64% con la obtenida del análisis genotípico, considerado hoy el “estándar de oro” para la identificación de especies de SCN. Menos satisfactoria aún resultó la identificación de especies obtenida de la lectura de los paneles de pruebas metabólicas y placas de sensibilidad a diferentes antibióticos del sistema de identificación comercial *Staph-Zym*TM, [Bonetto, 2010] el cual solamente permitió identificar presuntivamente a nivel de especie, sobre la base de una única sugerencia de identificación, sólo un 40% (121/302) de los aislamientos, de los cuales 71 (58,7%) necesitaron pruebas complementarias (Tabla 21). Entre los 181 aislamientos restantes 13 (7,2%) mostraron códigos numéricos no existentes en la lista de códigos del *Staph-Zym*TM y 37 (20,4%) que dieron más de una sugerencia de identificación necesitaron pruebas complementarias para definir la especie.

La sensibilidad de la identificación del kit comercial fue más alta para *S. simulans*, *S. xylosus* y *S. warneri*, mediana para *S. capitis*, *S. haemolyticus* y *S. epidermidis* y pobre o muy pobre para dos especies de las cuales una fue la más comúnmente hallada *S. chromogenes* (Tabla 21). Cabe destacar que las 23 cepas identificadas presuntivamente como *S. chromogenes* necesitaron en su totalidad pruebas adicionales para confirmar la especie.

Tabla 21. Identificación de especies de 302 SCN aislados a partir de leche bovina usando PCT-RFLP del gen *groEL* y el número aislamientos identificados correctamente usando una marcha bacteriológica convencional y *Staph-Zym*TM.

| Especie | N° de especies Identificadas por PCR-RFLP del gen <i>groEL</i> | Correctamente identificadas por marcha bacteriológica | | Identificadas como | n | Correctamente identificadas por <i>Staph-Zym</i> TM | | Identificadas como | n |
|------------------------|---|---|-----------------|--|-------------------------|--|-----------------|---|--|
| | | SI | NO | | | SI | NO | | |
| <i>S. chromogenes</i> | 126 | 89 (71) | 37 (29) | <i>S. capitis</i> <i>S. simulans</i> <i>S. epidermidis</i> | 23 12 2 | 23 (18) | 103 (82) | <i>S. capitis</i> <i>S. hyicus</i> <i>S. warneri</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. simulans</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. xyloso</i> No Identificada* | 37 22 14 10 8 4 3 5 |
| <i>S. haemolyticus</i> | 103 | 60 (58) | 43 (42) | <i>S. capitis</i> <i>S. simulans</i> <i>S. sciuri</i> <i>S. gallinarum</i> <i>S. epidermidis</i> | 20 13 5 4 1 | 52 (51) | 51 (49) | <i>S. warneri</i> <i>S. simulans</i> <i>S. capitis</i> <i>S. hyicus</i> <i>S. epidermidis</i> No Identificada* | 22 11 7 3 2 6 |
| <i>S. xyloso</i> | 27 | 19 (70) | 8 (30) | <i>S. gallinarum</i> <i>S. lentus</i> | 7 1 | 22 (81) | 5 (19) | <i>S. capitis</i> <i>S. hyicus</i> | 4 1 |
| <i>S. warneri</i> | 19 | 9 (47) | 10 (53) | <i>S. capitis</i> <i>S. lentus</i> <i>S. gallinarum</i> | 7 2 1 | 14 (74) | 5 (26) | <i>S. capitis</i> <i>S. simulans</i> No Identificada* | 2 1 2 |
| <i>S. simulans</i> | 8 | 8 (100) | 0 (0) | | | 7 (87) | 1 (13) | <i>S. hyicus</i> | 1 |
| <i>S. epidermidis</i> | 8 | 3 (37) | 5 (63) | <i>S. capitis</i> <i>S. carnosus</i> <i>S. saprophyticus</i> | 3 1 1 | 4 (50) | 4 (50) | <i>S. capitis</i> <i>S. warneri</i> | 2 2 |
| <i>S. capitis</i> | 7 | 7 (100) | 0 (0) | | | 4 (57) | 3 (43) | <i>S. warneri</i> <i>S. simulans</i> | 2 1 |
| <i>S. hyicus</i> | 4 | 0 (0) | 4 (100) | <i>S. capitis</i> | 4 | 1 (25) | 3 (75) | <i>S. warneri</i> <i>S. capitis</i> | 2 1 |
| TOTAL | 302 | 194 (64) | 108 (36) | | | 121 (40) | 181 (60) | | |

* No identificado por tener un código no existente en la lista de códigos del *Staph-Zym*TM

4.2. Evaluación de un nuevo esquema de identificación bioquímica sencillo para especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos con significancia clínica en mastitis bovina

Si bien los métodos moleculares son los más eficaces y sensibles para la identificación de especies de SCN, estas metodologías también tienen desventajas dado que requieren mucha laboriosidad, precisión, personal calificado, equipos y laboratorios adecuados, así como también de reactivos costosos.

Un esquema con un número reducido de pruebas fisiológicas y bioquímicas simples y de fácil implementación en laboratorios de diagnóstico veterinario, que permitiera la diferenciación de especies de SCN con significancia clínica en la mastitis bovina, permitiría tomar decisiones rápidas en el tratamiento y así limitar la duración y la posible diseminación de la enfermedad debida a este grupo bacteriano.

El análisis de los perfiles fenotípicos de cada especie disponible en la base de datos de Abis Encyclopedia (ver Materiales y Métodos), permitió diseñar el esquema propuesto en este trabajo (Figura 26), basado en la combinación de 8 pruebas fisiológicas y bioquímicas. El mismo fue probado para las 302 cepas de SCN. El análisis llevó a la identificación de *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. capitis* y *S. hyicus*.

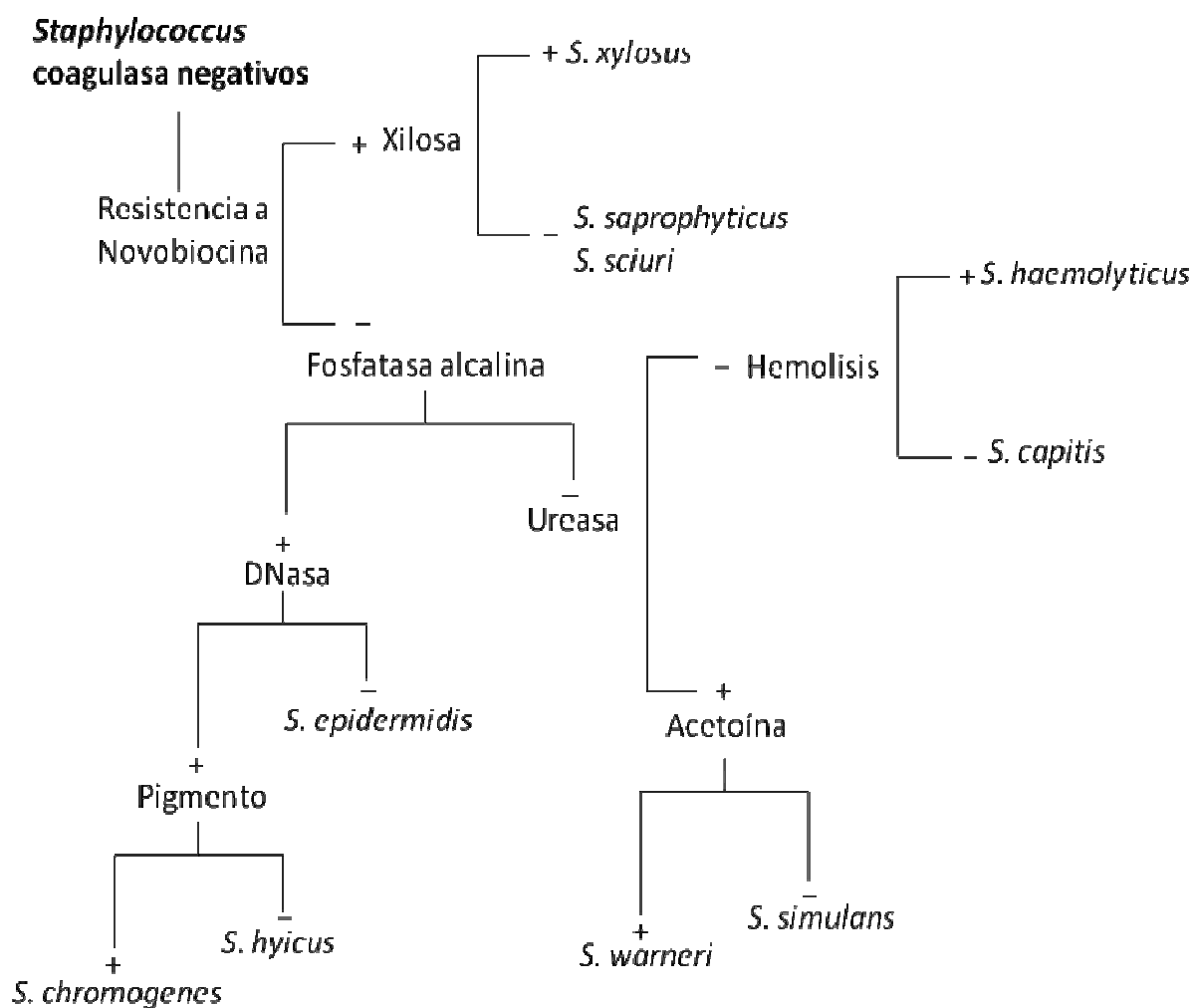


Figura 26. Esquema de identificación presuntiva de especies de SCN

En comparación con la identificación de especies de SCN por PCR-RFLP del gen *groEL*, el esquema sencillo permitió clasificar correctamente al 84% de los aislamientos (Tabla 22).

Tabla 22. Identificación de especies de SCN por el esquema sencillo de pruebas metabólicas comparada a la del método genotípico de referencia.

| Especies de SCN | Nº de cepas identificadas por PCR-RFLP del gen <i>groEL</i> | Nº de cepas correctamente identificadas por marcha bacteriológica sencilla | | Especies erróneamente identificadas como | n |
|------------------------|---|--|-------------|--|---|
| | | SI n (%) | NO n (%) | | |
| <i>S. chromogenes</i> | 126 | 115 (91) | 11 (9) | <i>S. epidermidis</i> | 7 |
| | | | | <i>S. haemolyticus</i> | 4 |
| <i>S. haemolyticus</i> | 103 | 90 (87) | 13 (13) | <i>S. capitis</i> | 4 |
| | | | | <i>S. hyicus</i> | 3 |
| | | | | <i>S. simulans</i> | 3 |
| | | | | <i>S. chromogenes</i> | 3 |
| <i>S. xylosus</i> | 27 | 27 (100) | 0 (0) | | |
| <i>S. warneri</i> | 19 | 15 (79) | 4 (21) | <i>S. capitis</i> | 1 |
| | | | | <i>S. haemolyticus</i> | 3 |
| <i>S. simulans</i> | 8 | 3 (38) | 5 (62) | <i>S. warneri</i> | 4 |
| | | | | <i>S. capitis</i> | 1 |
| <i>S. epidermidis</i> | 8 | 2 (25) | 6 (75) | <i>S. chromogenes</i> | 3 |
| | | | | <i>S. haemolyticus</i> | 2 |
| | | | | <i>S. capitis</i> | 1 |
| <i>S. capitis</i> | 7 | 2 (29) | 5 (71) | <i>S. haemolyticus</i> | 2 |
| | | | | <i>S. chromogenes</i> | 3 |
| <i>S. hyicus</i> | 4 | 0 (0) | 4 (100) | <i>S. haemolyticus</i> | 1 |
| | | | | <i>S. chromogenes</i> | 2 |
| | | | | <i>S. simulans</i> | 1 |
| Total | 302 | 254 (84) | 48 (16) | | |

La sensibilidad de este nuevo esquema de identificación de SCN es importante para aquellas especies aisladas con mayor frecuencia. Así, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus* y *S. warneri* mostraron porcentajes

elevados de identificación correcta 91%, 87%, 100% y 79%, respectivamente, al comparar la identificación a nivel de especie obtenida por la marcha bioquímica sencilla con aquella del método molecular de referencia.

4.3. Distribución de SCN en bajos, medianos y altos RCS

Según las categorías de RCS propuestas por Rodrigues y Ruegg, (2005), el (68,5%) de los aislamientos puros de SCN (302), obtenidos de muestras de leche compuesta provenientes del relevamiento de los 51 tambos pertenecientes a la cuenca lechera de Villa María, se encontraron en muestras de leche compuesta con $\text{RCS} \geq 250.000$ cél/ml (Figura 27), este resultado enfatiza la importancia de este grupo bacteriano en la mastitis subclínica.

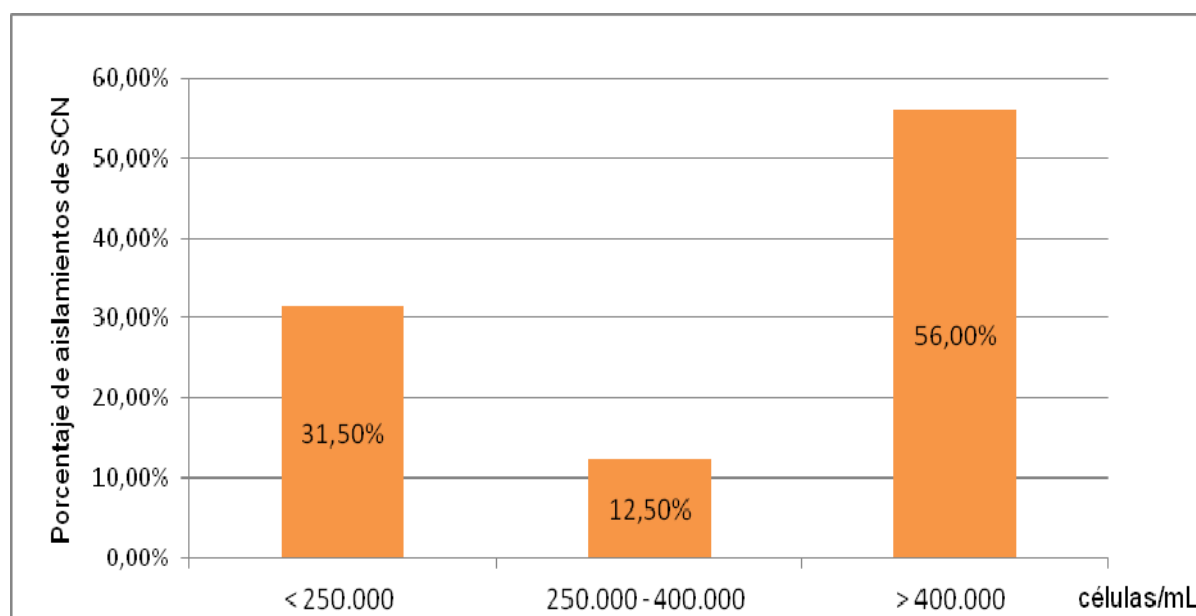


Figura 27. Porcentaje de aislamientos puros a SCN en relación al RCS

Al comparar el Ln de RCS con las diferentes especies de SCN identificadas en este estudio, se observó que las especies *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. simulans* y *S. hyicus* tuvieron un RCS mayor a las especies *S. xylosus* y *S. capitis* estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$) (Figura 28).

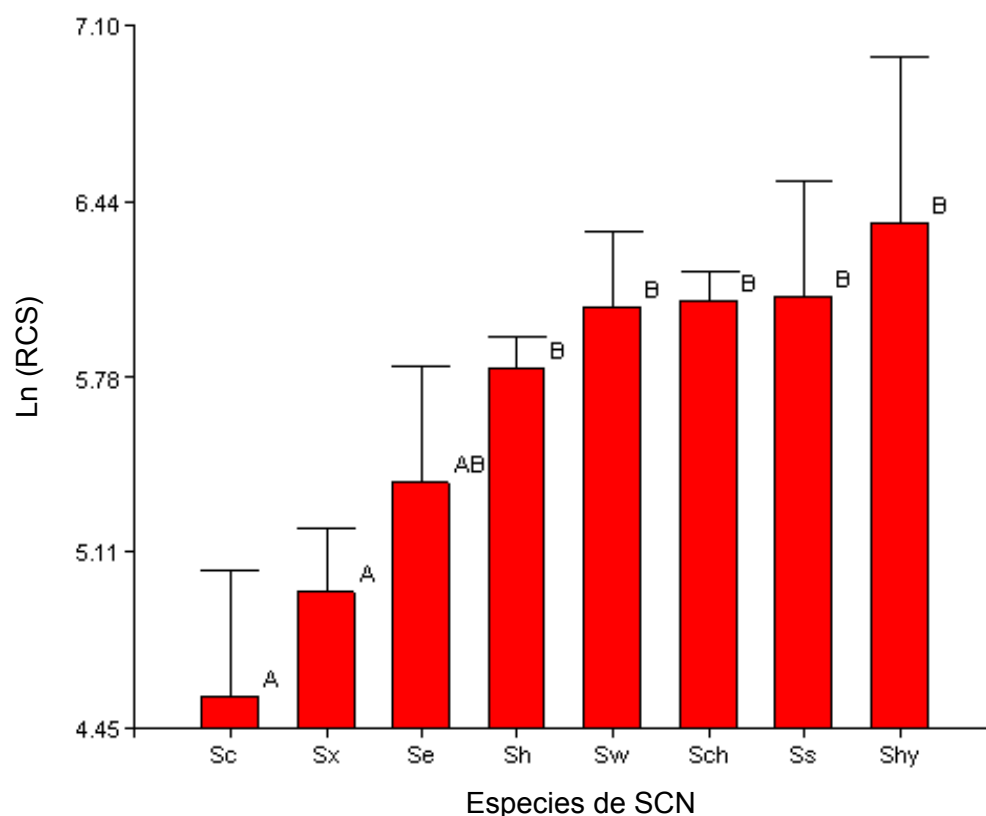


Figura 28. Aislamiento de diferentes especies de SCN asociados a RCS.

Ref: Sc: *S. capitis*, Sx: *S. xylosus*, Se: *S. epidermidis*, Sh: *S. haemolyticus*, Sw: *S. warneri*, Sch: *S. chromogenes*, Ss: *S. simulans*, Shy: *S. hyicus*.

4.4. Evaluación de la capacidad de producir factores de virulencia por diferentes especies de SCN

El surgimiento de los SCN como potenciales patógenos responsables de IIM, llevó a evaluar la capacidad de producir factores de virulencia con el fin de estimar el potencial poder patogénico de diferentes especies de este grupo bacteriano. Fueron analizadas las cepas de las especies *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus* y *S. warneri*, las cuales representan el 91% del total de cepas de este estudio.

4.4.1. Actividad lipolítica.

Al evaluar la producción de lipasas los resultados mostraron que un 41% (124/302) de las cepas de SCN fueron productoras de esta exoproteína, de las cuales la mayor proporción (70,6%; 89/126) correspondió a cepas de la especie *S. chromogenes*, seguida de un porcentaje considerablemente menor para las especies *S. xylosus*, *S. warneri* y *S. haemolyticus*, 33,3% (9/27), 21,1% (4/19) y 20,3% (21/103), respectivamente (Tabla 23).

4.4.2. Actividad proteolítica.

El 54,3% (164/302) de las cepas de SCN ensayadas mostraron actividad proteolítica sobre agar caseína. El 94,5% (119/126) de las cepas de *S. chromogenes* mostraron esta actividad enzimática y solamente el 25,2% de las cepas de *S. haemolyticus* (26/103). En tanto que las especies *S. xylosus* y *S. warneri* presentaron el 29,6% (8/27) y el 47,4% (9/19), de cepas productoras de exoproteasas, respectivamente (Tabla 23).

4.4.3. Sinergismo de hemólisis.

La totalidad de las cepas de SCN analizadas presentaron sinergismo de hemólisis (SH) en un porcentaje del 72,2% (218/302). Al analizar en particular esta actividad enzimática para las cuatro especies más prevalentes, elevados porcentajes de cepas de *S. chromogenes* (65,9%; 83/126), de *S. haemolyticus* (84,5%; 87/103) y de *S. xylosus* (74%; 20/27), mostraron SH. Para la especie *S. warneri* el porcentaje fue menor (53%, 10/19) (Tabla 23).

Tabla 23. Producción de factores de virulencia a partir de aislamientos de especies de SCN obtenidos de leches con niveles bajos y altos de RCS.

| Especie | RCS (cél/ml) | FACTORES DE VIRULENCIA (Nº de cepas) | | | | | |
|------------------------------|-----------------|--------------------------------------|----------|----------|----------|------------|----------|
| | | LIPASA | | PROTEASA | | SINERGISMO | |
| | | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo |
| <i>S. chromogenes</i> n=126 | <200.000 | 7 | 19 | 4 | 22 | 15 | 11 |
| | >200.000 | 30 | 70 | 3 | 97 | 28 | 72 |
| <i>S. haemolyticus</i> n=103 | <200.000 | 15 | 9 | 10 | 14 | 4 | 20 |
| | >200.000 | 67 | 12 | 67 | 12 | 12 | 67 |
| <i>S. xylosus</i> n=27 | <200.000 | 6 | 6 | 9 | 3 | 4 | 8 |
| | >200.000 | 12 | 3 | 10 | 5 | 3 | 12 |
| <i>S. warneri</i> n=19 | <200.000 | 4 | 2 | 4 | 2 | 4 | 2 |
| | >200.000 | 11 | 2 | 6 | 7 | 5 | 8 |
| <i>S. epidermidis</i> n=8 | <200.000 | 4 | 0 | 3 | 1 | 1 | 3 |
| | >200.000 | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| <i>S. simulans</i> n=8 | <200.000 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| | >200.000 | 5 | 1 | 5 | 1 | 2 | 4 |
| <i>S. capitis</i> n=7 | <200.000 | 6 | 0 | 6 | 0 | 4 | 2 |
| | >200.000 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| <i>S. hyicus</i> n=4 | <200.000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | >200.000 | 4 | 0 | 4 | 0 | 1 | 3 |
| Total | | 178 | 124 | 138 | 164 | 84 | 218 |

4.5. Formación de biofilm y distribución de genes asociados a biofilm entre especies de SCN.

Dada la laboriosidad del ensayo para detectar producción de biofilm en placas de multipocillos se analizaron aproximadamente el 50% de las cepas pertenecientes a las cuatro especies más prevalentes y de las especies menos prevalentes se analizaron cuatro cepas correspondiente a *S. epidermidis*, que si bien no es una de las especies de SCN asociada con mayor frecuencia a mastitis bovina es la más estudiada en la formación de biofilm. Los datos aquí mostrados (Tabla 24) revelan porcentajes distintos de cepas formadoras y no formadoras de biofilm 77,2% y 22,8% respectivamente. Entre las especies más prevalentes la mayor proporción de cepas productoras de biofilm se observó en la especie *S. haemolyticus*. Si bien en este estudio los porcentajes de aislamientos observados para las especies *S. xylosus*, *S. warneri* y *S. epidermidis* fueron bastante inferiores a los observados para *S. chromogenes* y *S. haemolyticus* hay que considerar los importantes porcentajes de cepas con capacidad de formar biofilm, encontrados para estas especies 75,0%, 77,8% y 100%, respectivamente.

Tabla 24. Distribución de la producción de biofilm y de genes asociados a biofilm entre especies de SCN.

| Información | Especies de SCN | | | | | Total (%) |
|-------------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|------------|
| | <i>S. chromogenes</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. xylosus</i> | <i>S. warneri</i> | <i>S. epidermidis</i> | |
| Número de aislamientos (%) | 64 (44,1) | 52 (35,9) | 16 (11,0) | 9 (6,2) | 4 (2,8) | 145 |
| Biofilm, n (%) | | | | | | |
| Negativo ($A_{660} < 0.112$) | 16 (25,0) | 11 (21,1) | 4 (25,0) | 2 (22,2) | 0 (0) | 33 (22,8) |
| Débil ($A_{660} 0.112-0.224$) | 36 (56,3) | 30 (57,8) | 3 (18,7) | 5 (55,6) | 3 (75) | 77 (53,1) |
| Fuerte ($A_{660} 0.225-0.450$) | 12 (18,7) | 11 (21,1) | 9 (56,3) | 2 (22,2) | 1 (25) | 35 (24,1) |
| Genes asociados a biofilm, n (%) | | | | | | |
| Ninguno | 11 (17,2) | 10 (19,2) | 2 (12,5) | 0 (0) | 0 (0) | 23 (15,9) |
| <i>icaB</i> | 1 (1,5) | 2 (3,8) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (50) | 5 (3,4) |
| <i>icaD</i> | 17 (26,5) | 14 (26,9) | 4 (25) | 1 (11,1) | 1 (25) | 37 (25,5) |
| <i>bap</i> | 1 (1,5) | 7 (13,5) | 14 (87,5) | 0 (0) | 1 (25) | 23 (15,9) |
| <i>eno</i> | 49 (76,6) | 38 (73,1) | 15 (93,7) | 7 (77,8) | 4 (100) | 113 (77,9) |

Es interesante resaltar que la habilidad de formar biofilm fue diferente entre los especies de SCN donde el mayor porcentaje de cepas fuertemente productoras de biofilm correspondió a la especie *S. xylosus* (Tabla 24 y Figura 29).

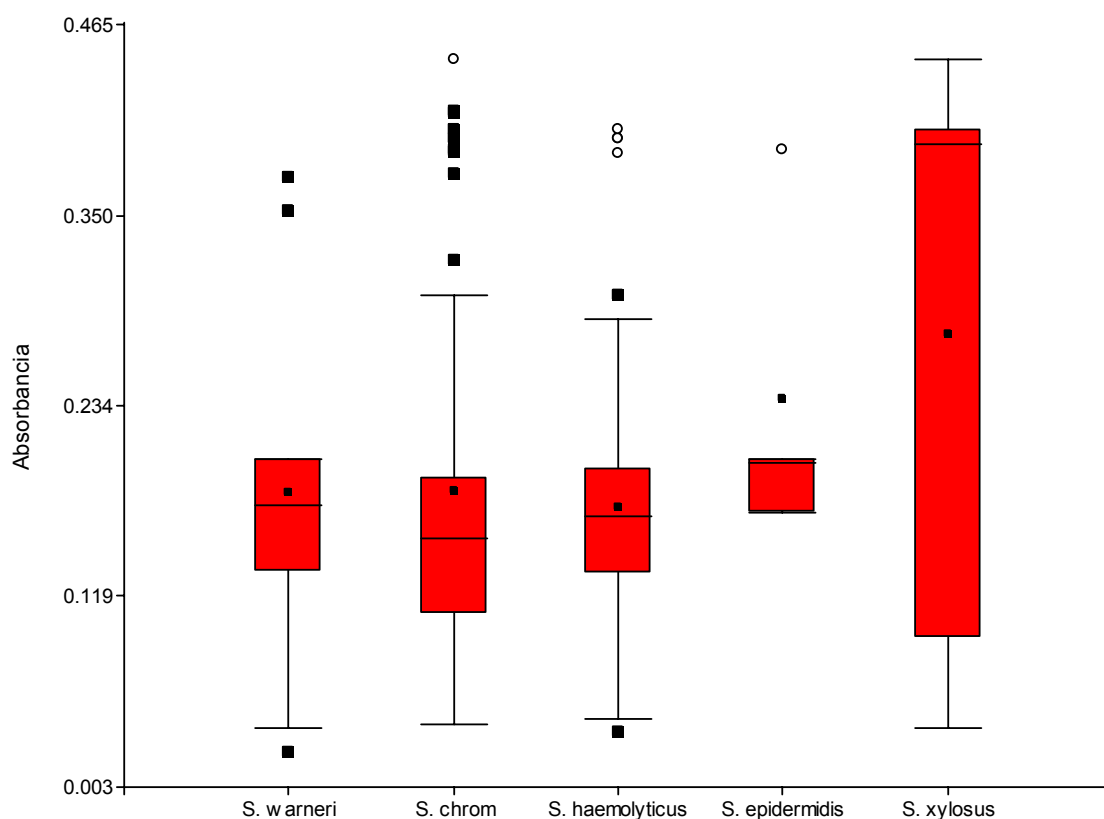


Figure 29. Habilidad (débil ó fuerte) de formar biofilm para las especies dominantes de SCN [*Staphylococcus chromogenes* (n = 64), *Staphylococcus haemolyticus* (n = 52), *Staphylococcus xylosus* (n = 16), *Staphylococcus warneri* (n = 9)].

Al investigar la presencia de genes asociados a biofilm entre las 145 cepas pertenecientes a las especies de SCN ensayadas, la mayoría (122, 84,1%) de los aislamientos fueron positivos al menos a 1 de los 4 genes asociados a biofilm analizados, y solamente (15,9%) fueron negativos a la totalidad de genes (Tabla 24). **icaA.** Los primers requeridos para amplificar *icaA* no permitieron detectar el gen en la cepa de referencia *S. aureus* Newman. Por esta razón, la presencia del gen *icaA* no fue investigada.

icaB. Solamente 5 aislamientos (3,4%) fueron positivos para *icaB*, no fue detectado este gen en ninguna cepas de las especies *S. xylosus* y *S. warneri*.

icaD. La distribución de *icaD* entre la mayoría especies se observó en una frecuencia moderada y similar (~25%). La única especie en este estudio que mostró un porcentaje más bajo (11,1%) fue *S. warneri*.

bap. Solamente 23 cepas (15,9%) fueron positivas para *bap* y la distribución del gen entre las especies de SCN varió considerablemente. La presencia del gen *bap* en *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* y *S. epidermidis*, fue escasa, en el 1,5%, 13,5% y 25 %, respectivamente, de las cepas. Por el contrario este gen fue detectado en la mayoría de las cepas de *S. xylosus* (87,5%).

eno. Un total de 113 (77,9%) aislamientos fueron positivos para el gen *eno*, pudiéndose observar en tres de las especies analizadas, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* y *S. warneri*, un porcentaje similar de cepas positivas (~75%). Además, este gen fue detectado en casi todas las cepas (93,7%) de *S. xylosus* y en todas las cepas de *S. epidermidis*, lo cual coincide con la fuerte capacidad de formar biofilm por estas especies (Tabla 24). El gen *eno* fue el único gen, entre los investigados en este trabajo que codifican para adhesinas intercelulares, que pudo ser detectado más comúnmente entre los SCN aislados de leche bovina.

La formación de esta estructura podría ser mediada por otros factores distintos de Bap, PIA ó MSCRAMM, por lo tanto, la relativamente baja detección de genes *icaB*, *bap*, e *icaD*, 3,5%, 15,9% y 25%, respectivamente, (Tabla 24) no implica necesariamente la incapacidad de formar biofilm.

La relación inversa también se observó al detectar el gen *eno*, el cual codifica para una de las proteínas de adhesión MSCRAMM, en el 30% de las cepas no formadoras de biofilm.

4.5.1. Perfiles genotípicos asociados a la producción de biofilm

Al analizar la diversidad de los perfiles genotípicos asociados a la producción de biofilm en las cepas de SCN en estudio se observó que cuando solo un gen era detectado la mayor proporción (44,4%) correspondió al gen *eno*. Cuando la presencia de dos genes fue analizada el perfil prevalente (69,4%) fue *eno/icaD* y por último la asociación de tres genes solo se detectó en un 13,4% sobre el total de las cepas analizadas y los tres perfiles se mostraron en idéntica proporción. El resto de las cepas formadoras de biofilm 4,5% no mostraron estar relacionadas con la presencia de los genes en estudio (Tabla 25).

Tabla 25. Perfiles genotípicos asociados a la producción de biofilm.

| Número de genes asociados a biofilm | | Cepas formadoras de biofilm, n (%) |
|-------------------------------------|----------------------|------------------------------------|
| Ninguno | | 5 (4,5) |
| 1 (uno) | <i>eno</i> | 19 (17) |
| | <i>icaB</i> | 14 (12,5) |
| | <i>icaD</i> | 10 (9) |
| 2 (dos) | <i>eno/icaB</i> | 5 (4,5) |
| | <i>eno/icaD</i> | 34 (30) |
| | <i>eno/bap</i> | 5 (4,5) |
| | <i>icaB/icaD</i> | 5 (4,5) |
| 3 (tres) | <i>eno/icaB/bap</i> | 5 (4,5) |
| | <i>eno/icaD/bap</i> | 5 (4,5) |
| | <i>eno/icaB/icaD</i> | 5 (4,5) |
| Total | | 112 |

Estos resultados muestran la presencia del gen *eno* y genes del operon *icaADBC*, relacionados a la formación de biofilm, en el 70% y 74%, respectivamente. En cambio el gen *bap* se detectó en un porcentaje muy bajo (13,4%) de las cepas formadoras de biofilm (Tabla 25).

4.6. Asociación entre la producción de factores de virulencia y formación de biofilm por diferentes especies de SCN y el grado de inflamación de la glándula mamaria.

Se evaluó a través del parámetro del RCS la potencial asociación entre la producción de distintos factores de virulencia y biofilm y la reacción inflamatoria de la glándula mamaria como consecuencia de la infección a SCN.

Al estudiar la relación entre la presencia de los factores de virulencia lipasas, proteasas y SH además de biofilm con niveles de RCS menores y mayores de 200.00 cél/ml, no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de cepas productoras en ambos niveles, así los valores encontrados fueron para lipasas 45% y 39,6%, para proteasas 52,5% y 54,9%, para SH 60% y 76,6% y para biofilm 79,7% y 75,3%, respectivamente (Tablas 23 y 26). Cuando se analizaron en las cuatro especies más prevalentes la proporción de cepas positivas a los factores de virulencia y biofilm en bajos y altos RCS se observó para *S. chromogenes* una mayor diferencia en la proporción de cepas positivas para SH entre RCS menores y mayores de 200.00 cél/ml (43% y 72%, respectivamente) no así en los otros factores, proteasas, lipasas y biofilm, donde la producción fue similar en ambos niveles de RCS. Para *S. haemolyticus* no se observaron diferencias en ninguno de los factores, incluso para proteasas se encontró un mayor porcentaje de cepas

productoras entre las aisladas de RCS <200.000 cél/ml. Para *S. xylosus* solo se observaron porcentajes levemente superiores en SH y biofilm en cepas aisladas de RCS >200.000 cél/ml. Finalmente, para *S. warneri* solo se observaron porcentajes moderadamente superiores para SH y proteasas en cepas aisladas de alto recuento (Tablas 23 y 26)

Tabla 26. Producción de biofilm a partir de aislamientos de especies de SCN obtenidos de leches con niveles bajos y altos de RCS.

| Especie | RCS (cél/ml) | Biofilm (Nº de cepas) | |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------|----------|
| | | Negativo | Positivo |
| <i>S. chromogenes</i> n=64 | <200.000 | 4 | 22 |
| | >200.000 | 12 | 26 |
| <i>S. haemolyticus</i> n=52 | <200.000 | 5 | 19 |
| | >200.000 | 6 | 22 |
| <i>S. xylosus</i> n=16 | <200.000 | 3 | 5 |
| | >200.000 | 1 | 7 |
| <i>S. warneri</i> n=9 | <200.000 | 1 | 3 |
| | >200.000 | 1 | 4 |
| <i>S. epidermidis</i> n=4 | <200.000 | 0 | 2 |
| | >200.000 | 0 | 2 |
| Total | | 33 | 112 |

4.7. Susceptibilidad antimicrobiana

La comparación directa de los estudios sobre la susceptibilidad antimicrobiana de SCN es a menudo difícil, no sólo debido a la identificación de las especies sobre la base de métodos fenotípicos y genotípicos, sino también debido a la utilización de diferentes metodologías y puntos de corte para las pruebas de susceptibilidad. Se evaluaron todas las especies de SCN para la susceptibilidad a cinco antibióticos utilizados de rutina en el tratamiento de la mastitis en vacas lecheras. La Tabla 27 muestra la resistencia y la distribución de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) ($\mu\text{g/ml}$), la CIM contra el 50% y el 90 % de los aislados (CIM_{50} y CIM_{90}) para 302 SCN aislados a partir de muestras de leche bovina.

Tabla 27. Patrón de resistencia a antimicrobianos y concentración inhibitoria mínima (CIM) para 302 SCN aislados a partir de muestras de leche bovina.

| Número de aislados de SCN para los cuales las | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|------|------|-----|----|-----|----|----|----|-----|-------------------|-------------------|------------------------------|
| CIMs (µg/ml) fueron | | | | | | | | | | | | | |
| Agentes antimicrobianos | ≤0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | >16 | CIM ₅₀ | CIM ₉₀ | Resistencia (%) ^a |
| Penicilina | 137 | 15 | 29 | 6 | 28 | 18 | 11 | 15 | 43 | | 0.25 | >8 | 49,7 |
| Oxacilina | | | 262 | 24 | 8 | 0 | 0 | 8 | | | 0.25 | 0.5 | 13,3 |
| Eritromicina | | | 115 | 99 | 15 | 6 | 11 | 56 | | | 0.5 | >4 | 29,1 |
| Tetraciclina | | | | | | 186 | 26 | 11 | 8 | 71 | 2 | >16 | 29,8 |
| Clindamicina ^b | | | | 229 | 21 | 11 | 41 | | | | 0.5 | >2 | NA |

Los campos blancos denotan el rango de diluciones probadas para cada antimicrobiano. CIMs por encima de los rangos probados son dadas como las concentraciones más cercano al rango. Las CIMs iguales o menores que las concentraciones más bajas probadas son dadas como la más baja concentración ensayada. Las líneas verticales indican los puntos de corte basados en el criterio interpretativo del CLSI 2008.

^aLos aislados categorizados como resistentes incluyen ambos "intermedios" y "resistentes".

^bClindamicina no está autorizada para el tratamiento de la mastitis bovina. En consecuencia no está disponible un punto de corte aprobado para la clasificación de aislados estafilococales bovinos provenientes de casos de mastitis como susceptibles o no susceptibles; NA, no aplicable.

El valor de CIM₉₀ hallado para penicilina resultó estar muy por encima del punto de corte recomendado [CLSI, 2008]. La CIM₉₀ más baja entre todos los antibióticos ensayados correspondió a oxacilina. La CIM₉₀ para los restantes antibióticos resultó entre 2 a 4 veces por encima del punto de corte recomendado [CLSI, 2008].

Al analizar los porcentajes de resistencia a los distintos antibióticos, el valor más elevado se observó para penicilina, mientras que el menor correspondió para oxacilina (Tabla 27). Dado que la clindamicina no está autorizada para el tratamiento de la mastitis bovina, no está disponible un punto de corte aprobado, por ello no se informan porcentajes de resistencia para este antibiótico.

4.7.1. Determinación de los perfiles fenotípicos de resistencia a antibióticos en especies de SCN.

La Tabla 28 muestra los perfiles de resistencia fenotípica de las especies de SCN obtenidas a partir de muestras de leche bovina. De los 302 aislamientos del SCN, 82 (27,2%) fueron fenotípicamente sensibles a todos los antimicrobianos probados en los ensayos de CIM. La proporción de SCN resistentes a un único compuesto o una sola clase de compuestos fue del 44,7% mientras que el porcentaje de cepas resistentes a múltiples fármacos fue del 28,1%.

Cabe señalar que en las especies más prevalentes *S. haemolyticus* y *S. chromogenes* la proporción de aislados resistentes a la penicilina fue significativa, 58,3% y 42,9%, respectivamente. Curiosamente, *S. hemolyticus* exhibió mayor resistencia a múltiples agentes antimicrobianos que *S. chromogenes*, 34,9% y 23,8%, respectivamente.

Tabla 28. Perfiles de resistencia fenotípica de SCN obtenidos a partir de muestras de leche bovina^a.

| Especies | Total | Resistencia fenotípica | | | | | | | | | |
|------------------------|-------|------------------------|----|---|----|----|----|----|----|----|---------------------|
| | | 0 | 1 | | | | 2 | | | | >2 |
| | | | P | O | E | T | PO | PT | PE | ET | |
| <i>S. chromogenes</i> | 126 | 35 | 17 | 0 | 20 | 17 | 7 | 10 | 3 | 0 | 3 POT, 7 POE, 7 PET |
| <i>S. haemolyticus</i> | 103 | 28 | 27 | 0 | 6 | 3 | 3 | 12 | 3 | 6 | 6 POE, 9 PET, |
| <i>S. xylosus</i> | 27 | 2 | 4 | 3 | 2 | 2 | 5 | 5 | 0 | 0 | 2 POT, 2 PET |
| <i>S. warneri</i> | 19 | 9 | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 POE |
| <i>S. simulans</i> | 8 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <i>S. epidermidis</i> | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 PET, 4 POET |
| <i>S. capitis</i> | 7 | 4 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| <i>S. hyicus</i> | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Total | 302 | 82 | 56 | 3 | 35 | 26 | 15 | 27 | 6 | 6 | 46 |

^a Cuando se observó resistencia fenotípica a 0, 1 o 2 compuestos, se muestra el número de los aislados con el perfil de resistencia especificada. Para aislamientos con resistencia >2 compuestos ensayados, se muestran los perfiles de resistencia. E = eritromicina; O = oxacilina, P = penicilina, T = tetraciclina

4.7.2. Detección de los genes de resistencia a β -lactámicos *blaZ* y *mecA*, en cepas de SCN.

La elevada resistencia a β -lactámicos detectada en las especies con mayor frecuencia de aislamiento, *S. chromogenes* y *S. haemolyticus* y dado que la resistencia a β -lactámicos puede deberse principalmente a la síntesis de β -lactamasas ó de proteínas alteradas de unión a la penicilina (PBP2a) [Odd y Maeland, 1997; Vignoli y Seija, 2008, Soares y col., 2012], codificadas por los genes

blaZ y *mecA*, respectivamente, se analizaron los perfiles genéticos de resistencia en las cepas de estas especies.

4.7.2.1. Detección por PCR de los genes *blaZ* y *mecA*

El tratamiento de unas pocas colonias con lisostafina y su posterior incubación a elevadas temperaturas permitió una adecuada lisis celular y una adecuada concentración de ADN cromosomal pudo ser usado como templado en la reacción de amplificación por PCR.

Los pares de cebadores correspondientes a los genes *blaZ* y *mecA* amplificaron exitosamente el fragmento de 517 pb y 533 pb, respectivamente como lo describe la bibliografía [Sawant y col., 2009] para las cepas de *S. chromogenes* y *S. haemolyticus* (Figura 30 y 31).

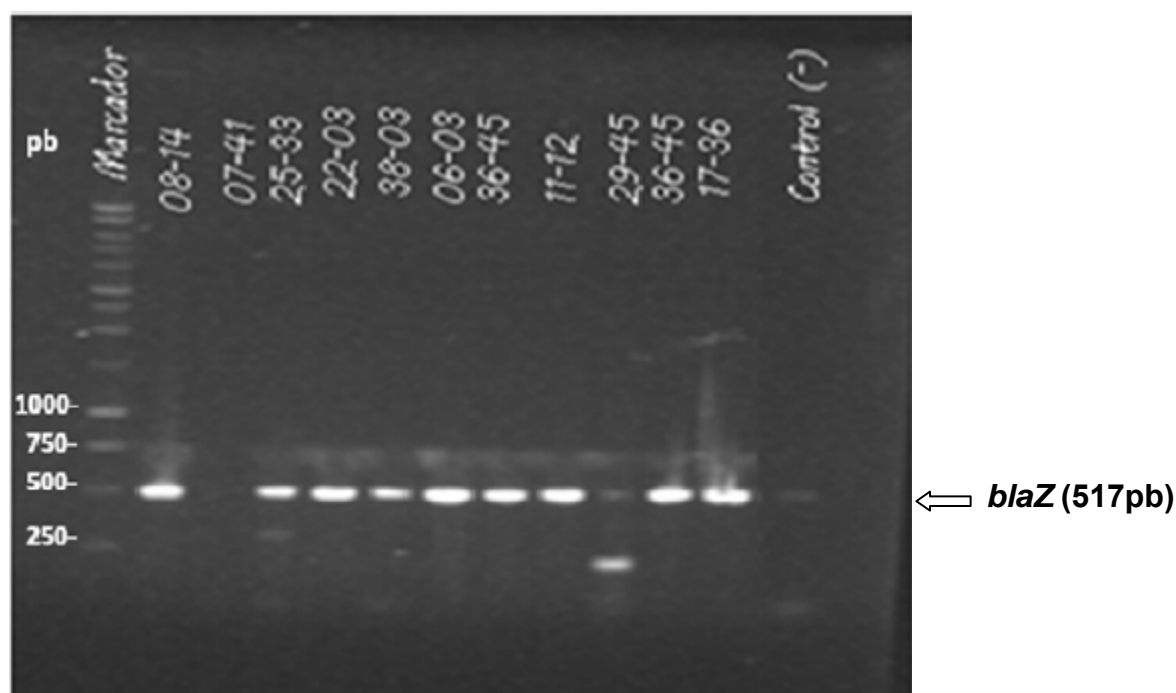


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa del amplicón de 517pb del gen *blaZ* para las cepas de *S. chromogenes* y *S. haemolyticus*.

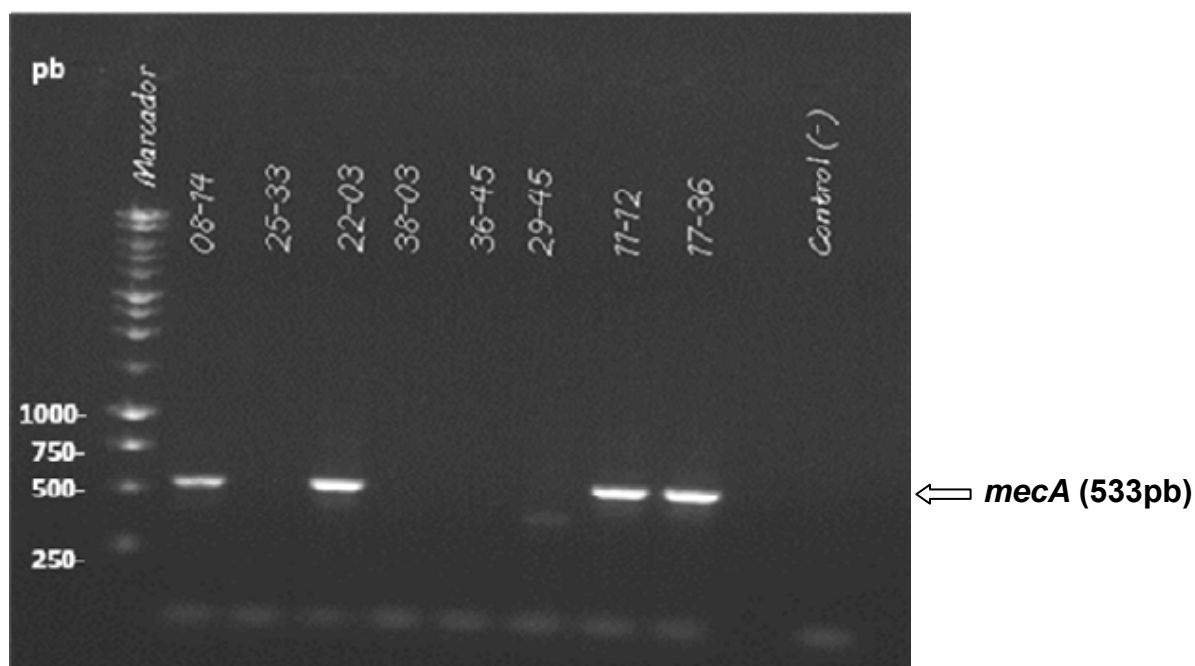


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa del amplicón de 533pb del gen *mecA* para las cepas de *S. chromogenes* y *S. haemolyticus*

4.7.2.2. Perfiles de resistencia genética a β -lactámicos

A partir de los resultados obtenidos de amplificar por PCR los genes *blaZ* y *mecA*, se pudo conocer para las cepas de las especies más prevalentes el grado de relación entre la presencia de los mismos y la resistencia fenotípica a β -lactámicos (Tabla 29).

Las cepas de *S. chromogenes* resistentes a penicilina revelaron presencia del gen *blaZ* sólo o en combinación con el gen *mecA* en un 88,8% (48/54).

Tabla 29. Perfil fenotípico de resistencia asociado a la presencia de genes de resistencia a β -lactámicos para especies de SCN.

| Especie/Perfil fenotípico de resistencia a β - lactámicos | n | Presencia de genes de resistencia a β -lactámicos | | | |
|--|-----|---|----------------------|----------------------|---------------------------|
| | | 0 n (%) | <i>blaZ</i> n (%) | <i>mecA</i> n (%) | <i>blaZ/mecA</i> n (%) |
| <i>S. chromogenes</i> / P | 37 | - | 19 (51,4) | 6 (16,2) | 12 (32,4) |
| <i>S. chromogenes</i> / PO | 17 | - | 9 (53) | - | 8 (47) |
| <i>S. haemolyticus</i> / P | 51 | 9 (17,6) | 29 (56,8) | 5 (9,8) | 8 (15,8) |
| <i>S. haemolyticus</i> / PO | 9 | - | 5 (55,5) | - | 4 (44,5) |
| Total | 114 | 9 (8) | 62 (54,4) | 11 (9,6) | 32 (28) |

Con respecto a las cepas de *S. haemolyticus* resistentes a penicilina, un porcentaje del 76,6% (46/60) se correlacionó con la presencia del gen que codifica para β -lactamasa sólo ó en combinación con el gen *mecA* (Tabla 29).

En lo referente a la presencia del gen *mecA* en las cepas analizadas, el gen sólo ó en combinación con el gen *blaZ* se detectó en el 35,2% (31/88) de las cepas resistentes a penicilina y sensibles a oxacilina.

El 46,2% (12/26) de las cepas resistentes a oxacilina estuvieron asociadas a la presencia del gen *mecA*. Por otra parte se debe resaltar el alto porcentaje de cepas (53,8%; 14/26) que fueron resistentes a oxacilina y el gen *mecA* no fue detectado. Únicamente en *S. haemolyticus* se encontraron cepas resistentes a β -lactámicos que no amplificaron ninguno de los dos genes investigados (Tabla 29).

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

5.1. Identificación molecular de especies de SCN

Las diferencias en las técnicas de diagnóstico y en los puntos de corte utilizados para definir "infección", así como en los métodos de identificación de especies probablemente contribuyen a la variación reportada en diferentes países, en la prevalencia de especies de SCN aislados a partir de muestras de leche bovina. La frecuencia de aislamiento de las especies de SCN identificadas por PCR-RFLP del gen *groEL* aquí mostradas, coinciden con lo publicado en un estudio previo, llevado a cabo en tres tambos comerciales en Bélgica, donde de un total de 179 SCN aislados de infecciones intramamarias (IIM) por SCN, *S. chromogenes* fue la especie más prevalente (46,4%) [Supré y col., 2011]. También en concordancia con los resultados de este estudio, Persson Waller y col. (2011) encontraron que esta especie fue una de las más frecuentemente aisladas (21%) a partir de mastitis subclínica bovina en tambos de Suecia. Sin embargo, *S. haemolyticus* se ha encontrado en proporciones variables en otros estudios. Nuestros resultados coinciden con los publicados por Piessens y col., 2011 y Pate y col., 2012 donde *S. haemolyticus* fue la segunda especie de SNC más comúnmente hallada 28,8% y 27,6%, respectivamente. Taponen y col (2007) y Persson Waller y col. (2011) informaron que *S. haemolyticus* fue la tercera y cuarta especie más frecuentemente aislada. Otros estudios demostraron que *S. haemolyticus* mostró prevalencia decreciente, causando 6% a 7% de todas las IIM a SCN [Taponen et al, 2006; Supré et al, 2011]. La elevada prevalencia encontrada en este estudio para algunas

especies, podría ser atribuida a la capacidad de las mismas para adaptarse a la glándula mamaria o a diferentes factores de los rodeos.

La comparación del método genotípico con las dos metodologías fenotípicas para la identificación de especies de SCN aisladas de leches bovinas, mostró la superioridad de identificación del método molecular. Estos hallazgos coinciden con los obtenidos por otros investigadores donde el método de identificación comercial comparado con métodos basados en el genotipo han mostrando un grado de acuerdo desde pobre a satisfactorio. Sampimon y col. (2009) en un estudio para determinar la especificidad y sensibilidad del método fenotípico *Staph-Zym*TM, en la identificación de SCN provenientes de muestras de leche bovina, a través de la comparación con la identificación de especies basada en el secuenciamiento parcial del gen “housekeeping” *rpoB*, mostraron sólo un 31% de aislamientos de SCN identificados correctamente por *Staph-Zym*TM sumado a la necesidad de realizar pruebas adicionales en un 66% para obtener la identificación de la cepa. Capurro y col. (2009) al comparar la identificación de especies por el kit comercial con la identificación de especies basada en el secuenciamiento parcial de otro de los genes “housekeeping”, el gen *tuf*, mostraron el 61% de cepas correctamente identificadas por el método fenotípico con un 33% de resultados que necesitaron pruebas adicionales. La incapacidad del kit comercial para identificar cepas de *S. chromogenes* sobre la base de una única sugerencia de identificación observada en este estudio coinciden con los hallados por otros autores [Sampimon y col 2009, Capurro y col 2009], lo que resulta una gran preocupación al considerar que *S. chromogenes* está entre las especies más comunes de SCN aisladas en leche bovina. La falta de coincidencia encontrada, entre métodos fenotípicos y genotípicos,

podría deberse a que los SCN son un grupo bacteriano con muchas especies, las cuales comparten un número importante de pruebas bioquímicas, que solo unas pocas permiten diferenciarlas y que la mayoría de las especies de SCN presentan resultados variables. Además, los sistemas comerciales como API Staph (BioMérieux, Francia) y *Staph-Zym*TM (Rosco, Dinamarca) si bien hay informes que muestran una exactitud entre un 70–90%, presentan el inconveniente de haber sido desarrollados principalmente para identificar cepas de origen humano (Heikens y col., 2005), con lo cual los resultados obtenidos para aislamientos bovinos no son completamente fiables y requieren pruebas adicionales para la identificación final [Thorberg y Brändström, 2000; Bes y col., 2000; Couto y col., 2001]. Sumado a todo esto debe también tenerse en cuenta que la interpretación de los resultados de las pruebas bioquímicas presenta ciertas variables, donde influye por ejemplo la lectura de cada observador, la calidad de los medios de cultivos, el tiempo de almacenamiento de las soluciones de los colorantes, etc. Así, cepas débilmente positivas son identificadas como negativas o la utilización o no de un carbohidrato no es tan fácilmente diferenciado, lo cual puede llevar a una incorrecta o ambigua interpretación de los resultados que conduce a una identificación errónea de las especies.

Todo lo expuesto ratifica que los métodos genotípicos son más fiables en la identificación de las especies de SCN causantes de IIM dada su mayor repetibilidad y precisión, permitiendo la construcción de bases de datos de referencia que se pueden actualizar con nueva información, sobre las especies y aislamientos atípicos, lo cual es mucho más problemático para los métodos fenotípicos convencionales

[Heikens et al, 2005; Capurro y col., 2009; Sampimon y col., 2009; Zadoks y Watts 2009; Ruegg, 2009; Park y col., 2011].

5.2. Identificación fenotípica de especies de SCN por una bacteriológica rápida y sencilla.

Las especies de SCN identificadas con el esquema propuesto destaca la utilidad del mismo ya que dichas especies, aunque en diferentes proporciones, están habitualmente asociadas a IIM [Devriese y col, 1994; Bes y col., 2000; Thorberg y Brändström, 2000; Barros y col., 2007; Santos da Silva y col. 2008., Sampimon y col., 2009; Rueg y col 2009; Piessens y col, 2012]. Así, con un número más bajo de pruebas metabólicas que las propuestas por otros investigadores, donde la rutina de identificación se hace tediosa y lenta [Devriese y col., 1985; Bannerman y col. 2003; Cunha y col., 2004; Brinda y col., 2010], se logró un porcentaje de fiabilidad importante, lo que alienta la potencial aplicación del esquema propuesto en laboratorios veterinarios de rutina para el diagnóstico de mastitis bovina a especies específicas de SCN.

5.3. Distribución de SCN en bajos, medianos y altos RCS

El elevado porcentaje de aislamientos de SCN en muestras de leche con elevados RCS es semejante al descrito por otros autores, los cuales aislaron en muestras provenientes de mastitis subclínicas a este grupo bacteriano en una proporción elevada, muchas veces superior a los patógenos mayores [Taponen y

col., 2007; Gillespie y col., 2009; Schukken y col., 2009; Sampimon y col., 2009b; Piepers y col., 2010; Paradis y col., 2010].

Las diferencias encontradas al comparar el In de RCS detectado en las muestras de leche con aislamientos de distintas especies de SCN también se han observado en otros estudios. Así, los resultados aquí mostrados coinciden con los informados por Thorberg y col., (2009) para las especies *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. simulans* y *S. hyicus*, las cuales mostraron una fuerte reacción inflamatoria medida por CMT. Sin embargo los grados elevados de inflamación informados por estos autores para *S. xylosus* y *S. epidermidis* no coinciden con los hallazgos de RCS observados en este estudio en las muestras de leche de las cuales fueron aisladas estas mismas especies. Sampimon y col. (2009) también informaron distintos valores de RCS para las diferentes especies de SCN, siendo *S. chromogenes*, *S. capitis* y *S. xylosus* las especies con RCS más altos que los observados en cuartos mamarios negativos al cultivo bacteriano, mientras que *S. epidermidis* y *S. hyicus* mostraron una tendencia a elevados RCS. Esos resultados solo coinciden en parte con los aquí descritos. Lo mismo ocurre con lo informado por Supré y col. (2011) quienes asociaron a las especies *S. chromogenes*, *S. simulans* y *S. xylosus* con RCS similares a los observados para *S. aureus*. La diferencia más llamativa con esos tres grupos de investigadores aparece con *S. xylosus* que en este estudio solo se encontró asociado a bajos RCS. Por otra parte es importante resaltar que esos estudios, sumados a los de Van den Borne y col. (2010) son coincidentes en informar, al igual que en este estudio, a la especie *S. chromogenes* asociada a elevados RCS.

Estos resultados indican que algunas especies de SCN son más relevantes en la mastitis subclínica que otras, mostrando la necesidad de una identificación. Sería necesario profundizar en posteriores estudios la dinámica de las infecciones de las diferentes especies de SCN en cuanto a IIM transitorias y persistentes, lo que implicaría posiblemente cambios en el manejo de los rodeos para la prevención y control de las mastitis a SCN.

5.4. Factores de virulencia de SCN: lipasas, proteasas y sinergismo de hemólisis

Al analizar los diferentes factores de virulencia en las cepas de SCN el moderado porcentaje de actividad lipolítica no pudo ser comparado con otros estudios debido a la ausencia de información bibliográfica referente a porcentajes de cepas con capacidad de producir esta exoproteína para las especies de SCN comúnmente aisladas de mastitis bovina. Dado que la actividad de lipasas puede contribuir a la patogénesis del microorganismo productor sumado a que la actividad bactericida de los lípidos de la leche [Sprong y col., 2001] puede resultar afectada o neutralizada por la actividad de estas enzimas [Lu y col., 2012], el porcentaje de cepas de *S. chromogenes* con actividad de lipasas observado en este estudio permitiría ubicar a esta especie como la de mayor potencial patogénico dentro de las especies de SCN.

El porcentaje de todas las cepas de SCN con actividad proteolítica hallado en este estudio fue superior al informado por Bochniarz y Wawron (2012), 31% e inferior a Marques y col (2013) 66,9%. Cuando el análisis se centró en especies de

SCN los resultados aquí obtenidos son coincidentes, con los de estos autores, para *S. chromogenes* ya que es la única especie que presentó elevados porcentajes de actividad proteolítica. En lo que respecta a los porcentajes aquí mostrados para las especies *S. haemolyticus*, *S. xylosus* y *S. warneri* no pudieron ser comparados ya que Bochniarz y Wawron (2012) no hallaron actividad proteolítica para estas especies.

El porcentaje de cepas de SCN que resultaron positivas al SH fue semejante al reportado por Donvito y col., (1997) y Hébert y Hancock (1985), 70% y 69%, respectivamente. Sin embargo, Watts y Owens (1987) y Marques y col (2013) informaron porcentajes significativamente menores 34,5% y 44,1%, respectivamente, para este grupo bacteriano. El análisis de este factor de virulencia para especies particulares de SCN realizado en este estudio pudo ser comparado con los resultados obtenidos por otros investigadores. El porcentaje observado para *S. chromogenes* en este estudio está muy por encima del informado por Watts y Owens (1987), 12,7%. Con respecto al valor hallado en *S. haemolyticus* fue similar a los reportados por Donvito y col., (1997) y Hébert y Hancock (1985), 92% y 100%, respectivamente y superior al informado por Watts y Owens (1987), 33,3%. Los valores de SH detectados en este trabajo para la especie *S. xylosus* se corresponden con el hallado por Hébert y Hancock (1985), 71%, sin embargo es considerablemente superior al informado para la misma especie por Watts y Owens (1987), 33,3% y Donvito y col. (1997), 36%. Para *S. warneri* si bien la proporción de cepas que presentaron SH fue superior al 50% fue menor a los informados por Donvito y col (1997), Hébert y Hancock, (1985) y Watts y Owens (1987), 64%, 79% y 83,3%, respectivamente.

En general estos datos reflejan la importante presencia de este factor de virulencia en la mayoría de las especies en estudio y dada la potencial relación de esta citolisina con la virulencia del microorganismo [Hébert y Hancock, 1985; Watts y Owens, 1987] resalta la significancia clínica de dichas especies.

5.5. Biofilm en las especies de SCN: formación y genes asociados.

Con la excepción de *S. epidermidis*, hay información muy limitada sobre la formación de biofilm por otras especies de SCN y en el caso de SCN asociados a la mastitis bovina, se limita a 2 estudios [Simojoki y col., 2012; Tremblay y col. 2013]. El porcentaje de cepas biofilm positivas hallado en este estudio es superior al observado por Simojoki et al. (2012) donde la mayoría de los SCN fueron negativos (68,7%) y una minoría de los aislados fueron positivos (31,3%). No obstante, el 77,2% de cepas biofilm positivas aquí descripto es levemente inferior al informado por Tremblay y col 2013, quienes en un estudio de 255 aislamientos de SCN obtenidos a partir de muestras de leches provenientes de tambos de Canadá mostraron que la mayoría (85.1%) de los aislados ensayados eran biofilm positivos, y una minoría (14,9%) eran biofilm negativos. Además, los porcentajes de cepas formadoras de biofilm observados por Tremblay y col., (2013), fueron para *S. chromogenes*, *S. xylosus* y *S. haemolyticus*, ligeramente superiores, 84,7%, 92%, 93,3%, respectivamente y para *S. epidermidis* inferior (77%), a los mostrados en este estudio para las mismas especies. Marques y col. (2013) observaron que de 145 aislamientos de SCN de muestras de leche bovina a partir de establecimientos lecheros del sur de Brasil, 74,5% fueron formadores de biofilm, este resultado es muy similar al encontrado en la cuenca lechera correspondiente a este estudio. Los

elevados porcentajes de cepas fuertemente productoras de biofilm observada para la especie *S. xylosus* también fue informado por Trembley y col. (2013) quienes investigaron la capacidad de formar biofilm por aislamientos de SCN de origen bovino. Incluso un estudio con aislamientos de origen humano también demostró que un alto número de cepas (11/12) de *S. xylosus* fueron capaces de formar biofilm [Planchon y col. 2006]. Estos trabajos apoyan el resultado mostrado en este estudio donde *S. xylosus* tiene un fuerte potencial de formación de biofilm. Por lo tanto, al ser diferente la distribución de las especies de SCN hallada en cada estudio, probablemente influya en el porcentaje general de SCN formadores de biofilm y puede ofrecer una explicación para la diferencia observada entre este estudio y los resultados informados por Simojoki y col. (2012), Tremblay y col. (2013) y Marques y col., (2013).

El hecho de que cepas pertenecientes a las especies de SCN aisladas con mayor frecuencia sean capaces de formar biofilm en un porcentaje relativamente elevado, es una característica relevante considerando que esta forma de crecimiento protege a la bacteria de las altas concentraciones de antibióticos y de la fagocitosis. Al investigar la presencia de genes asociados a biofilm la alta proporción de aislamientos con presencia de al menos uno de los 4 genes estudiados fue similar a lo informado por Tremblay y col., (2013), quienes en el análisis de 6 genes asociados a biofilm comparten con este estudio los genes *icaA* y *bap*. Con respecto a la presencia de los genes del operón *icaADBC* los resultados hallados para el gen *icaD* fueron similares a los informados por Marques y col. (2013) quienes detectaron la presencia de este gen en un 24,4% del total de cepas de SCN analizados. Los resultados de este estudio con respecto a la presencia de los otros dos genes

asociados a biofilm, *bap* y *eno*, pueden ser discutidos con otros investigadores, para *bap* resultaron muy similares a los informados por Tremblay y col. (2013) quienes encontraron solamente 37 aislamientos (14,5%) con presencia del gen y la distribución entre las especies de SCN fue también variada al igual que en este estudio. Sin embargo, estos resultados son diferentes a los informados por Simojoki y col. (2012) quienes no lograron amplificar este gen en ninguna de las cepas de las diferentes especies de SCN aisladas de mastitis bovina, entre las cuales comparte con este estudio a *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, y *S. chromogenes*. Por otra parte, el alto porcentaje de cepas con presencia del gen *eno* observado en las cepas aquí analizadas es similar al informado por Simojoki y col (2012) donde el gen fue detectado en el 91% (20/22) de las cepas de *S. chromogenes* y en el 100% de las cepas de *S. haemolyticus* (18), *S. epidermidis* (10) y *S. spp* (10). Este gen también se ha encontrado en un porcentaje relativamente alto (55%) en SCN aislados de infecciones en perros y cerdos [Seo y col., 2008]. Estos resultados sugerirían una potencial participación de la proteína de unión a laminina en la estabilidad estructural del biofilm. Sin embargo, hay evidencias de altos porcentajes de cepas biofilm negativas con presencia del gen *eno* tanto en este estudio como en el de Simojoki y col (2012) donde si bien mostraron un porcentaje elevado (68,7%) de SCN biofilm negativos el gen *eno* fue el único gen entre los que codifican las proteínas de adhesión MSCRAMM, más comúnmente detectado (75%) en los SNC aislados en mastitis. Estos resultados aparentemente contradictorios podrían explicarse en parte a que el uso de métodos genotípicos no facilita la interpretación, porque sumado a que el proceso de formación de biofilm es complejo no todos los genes implicados en la formación de biofilm son conocidos [Stevens y col. 2009; Los y col., 2010]. Por

otro lado, la detección de biofilm asociada a genes usando primers universales es posible cuando las secuencias de los genes están muy conservadas. La variación de las secuencias puede conducir a la no amplificación de la secuencia del gen y a un resultado falso negativo.

Es importante señalar que el alto porcentaje de cepas formadoras de biofilm, detectado en este estudio, posiblemente podría resultar importante en las especies de SCN ambientales para la supervivencia en ambientes secos y pobres en nutrientes. Además, estas cepas en los rodeos lecheros podrían desempeñar un papel en la transmisibilidad, dada la potencial formación de reservorios, por ejemplo, en cañerías de las líneas de ordeño.

5.6. Asociación entre la producción de factores de virulencia por diferentes especies de SCN y el grado de inflamación de la glándula mamaria.

Al evaluar la potencial relación entre la inflamación de la glándula mamaria con la producción de factores de virulencia y formación de biofilm por los SCN aislados, no fue posible atribuir el elevado recuento a un factor en particular ya que en proporciones similares también se detectó la producción de cada uno de estos factores en cepas aisladas de RCS bajos, así no queda claro si son de hecho factores de virulencia o simplemente características comunes de estas bacterias, por lo tanto debería ser evaluada la exacta contribución de los factores examinados a la virulencia de los SCN “in vivo”.

Cuando especies en particular fueron analizadas, solamente en *S. chromogenes* se pudo detectar entre los aislamientos provenientes de leches con

altos RCS, una mayor proporción de cepas productoras de δ -toxina, observado como un resultado positivo para el SH, que en aquellos aislamientos provenientes de leches con RCS ≤ 200.000 cél/ml. Sin embargo este resultado no coincide con lo informado por Watts y Owens, (1987) quienes no observaron diferencias en los niveles de RCS entre cepas positivas y negativas al SH.

Finalmente, al igual que otros investigadores [Türkyilmaz y Kaya., 2006; Taponen y Pyörälä, 2009; Malinowski y col., 2011], se puede concluir que varios potenciales factores de virulencia además de la formación de biofilm se han detectado en las cepas de SCN analizadas, pero la asociación de la producción de los mismos con la severidad de la mastitis permanece sin explicación.

5.7. Susceptibilidad antimicrobiana

El valor de CIM₉₀ hallados en este estudio para penicilina resultó muy superior al previamente informado en el país por Gentilini y col., (2002). Sin embargo, en otros estudios se ha reportado una gran variabilidad en la CIM₉₀ para penicilina en los SCN, que van desde 0,25 µg/ml a 32 µg/ml [Thornsberry y col., 1997; Salmón y col., 1998; Gianneechini y col., 2002; Bengtsson y col., 2009; Rajala-Schultz y col., 2009; Persson y col., 2011] Por otra parte, la CIM₉₀ encontrada para oxacilina muestra a este antibiótico como el más activo de todos los agentes antimicrobianos probados contra este grupo de microorganismos. En nuestro país, fueron descriptos resultados similares (CIM₉₀ 0,38 µg/ml) por Gentilini y col. (2002). Sin embargo, la CIM₉₀ para oxacilina reportada en otros estudios varió de 0,5 µg/ml [Gianneechini y col., 2002; Lüthje y Schwarz, 2006; Sawant y col., 2009] a 4 µg/ml [Pitkälä y col.,

2004; Bengtsson y col., 2009; Rajala–Schultz y col., 2009; Persson y col., 2011]. La variabilidad observada en los valores de CIM₉₀ de la actividad antimicrobiana de la penicilina y oxacilina contra SCN sostiene la relevancia de la determinación de los patrones de susceptibilidad a β-lactámicos para este grupo de bacterias. En este estudio, la CIM₉₀ para la eritromicina fue mayor que la descrita anteriormente en un estudio realizado en Argentina (0,75 µg/ml) [Gentilini y col., 2002], y son coincidentes con los reportados previamente para SCN en EE.UU [Rajala-Schultz y col., 2009]. Sin embargo, los estudios en otros países muestran valores de CIM₉₀ que van de 0,5 µg/ml [Pitkälä y col., 2004; Persson y col., 2011] a 1 µg/ml [Lüthje y Schwarz, 2006; Bengtsson y col., 2009; Sawant y col., 2009]. Con respecto a los resultados obtenidos para tetraciclina, fueron superiores a los de otros países como Finlandia, Suecia y EE.UU, donde incluso se ha reportado una gran variabilidad en las CIM₉₀ para este agente antimicrobiano, que van desde 1 µg/ml y >8 µg/ml, respectivamente [Pitkälä y col., 2004; Bengtsson y col., 2009; Rajala–Schultz y col., 2009; Persson y col., 2011]. Finalmente, el valor de CIM₉₀ para clindamicina obtenido fue similar al descrito anteriormente en nuestro país por Gentilini y col. (2002). Sin embargo, fue más alto que la reportada por otros investigadores en diferentes países (0,5 µg/ml-1 µg/ml) [Pitkälä y col., 2004; Lüthje y Schwarz, 2006; Bengtsson y col., 2009; Persson y col., 2011].

La resistencia a la penicilina encontrada en este estudio para todos los aislamientos de SCN fue más alta que la descrita anteriormente en Argentina y Uruguay [Gentilini y col., 2002; Giannechini y col., 2002], y en los estudios llevados a cabo en los Países Bajos (30%) [Sampimon y col., 2011], EE.UU (2,1%) [Rajala-

Schultz y col., 2009] y Suecia (12,5%) [Bengtsson y col., 2009]. La resistencia a la oxacilina informada aquí fue similar a la informada previamente en otros países [Pitkälä y col., 2004; Rajala- Schultz y col., 2009; Sawant y col., 2009; Persson y col., 2011] y numéricamente inferior a la hallada por Sampimon y col., (2011). Sin embargo, hay informes de otros países, entre ellos Argentina, donde se han detectado aún porcentajes menores de cepas de SCN resistentes a este antibiótico [Gentilini y col., 2002; Gianneechini y col., 2002; Lüthje y Schwarz, 2006; Bengtsson y col., 2009]. En general, a partir de este estudio se observaron diferencias notables en la resistencia a la tetraciclina y a la eritromicina en relación a la descrita por varios autores, que van del 2% al 19,6%, y del 1% al 18%, respectivamente [Gentilini y col., 2002; Gianneechini y col., 2002; Pitkälä y col., 2004; Lüthje y col., 2006; Bengtsson y col., 2009; Rajala-Schultz y col., 2009; Sawant y col., 2009; Persson y col., 2011; Sampimon y col., 2011].

La proporción de SCN resistentes a un único compuesto o una sola clase de compuestos obtenidos en este estudio fue similar a la descrita por Sampimon y col. (2011) sin embargo, se detectó una diferencia considerable en el porcentaje de cepas resistentes a múltiples fármacos entre los resultados aquí descritos y los publicados (10,6%) por estos autores. Curiosamente, *S. hemolyticus* exhibió mayor resistencia a múltiples agentes antimicrobianos que *S. chromogenes*. Estos resultados difieren con los de Sampimon y col. (2011) quienes informaron ausencia o menor porcentaje de cepas resistentes a múltiples fármacos para ambas especies.

La presencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos en diferentes especies de SCN se debe a la falta de políticas de restricción en el uso

indiscriminado de antibióticos, lo cual conduce a la presencia de cepas multiresistentes como así también a un elevado nivel de resistencia. Esto tiene implicancias negativas en el tratamiento de las infecciones en animales, ya que no sólo dificulta el control de la enfermedad, sino que provoca un impacto negativo en la salud humana, debido a la posible transmisión de cepas resistentes al hombre a través del consumo de productos lácteos no pasteurizados, y en la industria láctea por la presencia de residuos de antibióticos en la leche, lo que interfiere con el proceso de fabricación de productos lácteos fermentados [Faría y col., 2002].

La relación *epidemicidad – resistencia a antibióticos*, ha sido informada por Martínez y Baquero (2002), los autores sostienen que las bacterias con alta tasa de difusión están en contacto con más tipos de microorganismos, pudiendo adquirir genes de resistencia por transferencia horizontal. Una vez adquirido el fenotipo resistente, una bacteria epidémica puede difundirse ampliamente. La presión de selección convertirá este organismo en un clon predominante dentro de la especie bacteriana. Por ello es importante vigilar la resistencia a los antimicrobianos no solo de los principales patógenos de la mastitis bovina, como *S. aureus* y *S. agalactiae*, sino también de los SCN.

Cuando se analizó el perfil fenotípico de resistencia asociado a la presencia de genes *blaZ* y *mecA* para las especies más prevalentes de SCN, el elevado porcentaje de cepas de *S. chromogenes* resistentes a penicilina asociados a la presencia del gen *blaZ* sólo o en combinación con el gen *mecA* resultó similar al informado por Sampimon y col. (2011) en su estudio de susceptibilidad antimicrobiana de SCN aislados de muestras de leche bovina. Con respecto a las

cepas de *S. haemolyticus* resistentes a penicilina el resultado hallado fue mayor al informado por los investigadores antes mencionados, donde sólo el 55% de las cepas correspondientes a esta especie revelaron presencia del gen *blaZ*. Dado que el gen que codifica para β -lactamasa, en general está localizado en plásmidos de pequeño tamaño que se pueden transferir de célula a célula por transducción ó bien en plásmidos más grandes, junto a genes que codifican otros mecanismos de resistencia, los cuales se pueden transferir por conjugación no solamente entre cepas de *S. aureus* sino también entre cepas de *S. aureus* y de SCN, sería interesante en estudios futuros, analizar la presencia de plásmidos en estas cepas.

En lo referente a la presencia del gen *mecA* en las cepas resistentes a penicilina y sensibles a oxacilina analizadas, ya sea como único gen ó en combinación con el gen *blaZ*, la presencia de cepas positivas a la amplificación de los genes podría ser atribuido a una resistencia heterogénea a la oxacilina lo cual se da cuando toda la población tiene el gen *mecA* pero muchas células no expresan resistencia a este β -lactámico [Imran y col., 2010; Morosini y col., 2012]. Esto es un problema para el personal de laboratorio clínico porque las células que expresan la resistencia crecen más lentamente que la población susceptible. Esta heterogeneidad puede conducir al fracaso del tratamiento debido a la falsa apariencia de susceptibilidad. El porcentaje de cepas con resistencia a oxacilina asociados a la presencia del gen *mecA*, encontrado en este estudio si bien fue inferior al informado por otros investigadores en EEUU y Alemania [Sawant 2009; Feßler y col., 2010], diferentes especies de SCN estuvieron involucradas en esos estudios, donde la presencia del gen que codifica para PBP2a fue del 64,7% y 93,7%, respectivamente. Por otra parte se debe resaltar el alto porcentaje de cepas

pertenecientes a las especies más prevalentes que fueron resistentes a oxacilina y el gen *mecA* no fue detectado, esto puede atribuirse a otros mecanismos como la inactivación de oxacilina por aumento de la producción de β -lactamasa, codificada por el gen *blaZ* (Soares y col., 2012).

Se debe tener en cuenta que durante los últimos años es motivo de atención, la resistencia a la meticilina/oxacilina observada en bacterias aisladas de animales. Se sabe que la utilización de antibióticos para el tratamiento de la mastitis puede promover en el ganado lechero la aparición o la supervivencia de *S. aureus* resistente a la meticilina (SA-MR) y de otros estafilococos resistentes a este antibiótico (S-MR) (Moon y col., 2007; García-Álvarez y col. 2009). Sin embargo, hay poca información disponible sobre la resistencia a meticilina en SCN (SCN-MR) aislados de bovinos, es por ello que los resultados obtenidos en este estudio deberían ser tenidos en cuenta en el potencial surgimiento de cepas meticilina resistentes.

El bajo porcentaje de cepas negativas para la amplificación de ambos genes detectado en las cepas resistentes a β -lactámicos de la especie *S. haemolyticus* podría deberse a un trastorno de permeabilidad que se corresponde fundamentalmente con la disminución de la expresión de porinas (Vignoli y Seija, 2008), lo cual estaría impidiendo el ingreso del antibiótico a la célula.

La resistencia a múltiples antimicrobianos observada en este estudio al evaluar los perfiles de resistencia fenotípica y genotípica sugiere que los SCN pueden servir como reservorios importantes de genes de resistencia que podrían ser transferidos a otros estafilococos incluyendo especies más virulentas como

S. aureus [Sawant y col., 2009; Soares y col., 2012], de allí la importancia de una correcta identificación y caracterización de los aislamientos de SCN obtenidos en establecimientos lecheros, para ayudar a definir el tratamiento y las decisiones de control sanitario sobre la mastitis bovina.

6. Bibliografía

- 1- Aarestrup FM, Jensen NE. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. J. Dairy Sci. 1997; 80: 307-312.
- 2- Aba L. Continúan las pérdidas por mastitis. Motivar. 2006, 4: 10-11.
[Online] http://www.produccionbovina.com/42-perdidas_por_mastitis.pdf
- 3- Abd-el-Malek, Gibson T. Studies in the bacteriology of milk. II. The staphylococci and micrococci of milk. J. Dairy Res. 1948; 15: 249-260.
- 4- Abis. Regnum Prokaryotae *Staphylococcus* [Online] <http://www.tgw1916.net/>
(Base de datos)
- 5- Aires de Souza M, Parente CESR, Olney Vieira-da-Motta, Bonna ICF, Silva DA., de Lencastre H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. Am. Soc. Microbiol. 1997; 73: 3845–3849.
- 6- Alcaraz L, Satorres S, Lucero R, Puig de Centorbi O. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. Brazilian Journal of Microbiology. 2003; 34: 45-51
- 7- Allignet JS, Aubert KGH, Dyke, El Solh N. *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the *ica* operon involved in biofilm formation. Infect. Immun. 2001; 69: 712-718.
- 8- Almeida RA, Oliver SP. Interaction of coagulase negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. Microbiol. Pathogenesis 2001; 31: 205-212.
- 9- Altreuther P, Bottner A, Scheer M, Schmid P, Traeder W, Weiskopf S. Observations on resistance monitoring in animal health. Berl. Munch. Tierarztl.

Wochenschr. 1997; 110: 418-421.

10- Andrew SM, Moyes KM, Borm A A, Fox LK, Leslie K E, Hogan JS, Oliver S, Schukken YH, Owens WE, Norman C. Factors associated with the risk of antibiotic residues and intramammary pathogen presence in milk from heifers administered prepartum intramammary antibiotic therapy. Vet. Microbiol. 2009; 134: 150-156.

11- Antimicrobial resistance Bibliography. Division of Disease Prevention and Control Communicable Diseases Program, Washington DC: Pan American Health Organization. 2001

12- Anaya-López JL, Contreras-Guzmán OE, Cárabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre, VM, López-Meza JE, Valdez-Alarcón JJ, Ochoa-Zarzosa A. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. Res. Vet. Sci. 2006; 81: 358-361.

13- Ávila Téllez S, Gutiérrez Chávez A J. Producción de leche con Ganado bovino. 1ª edición. Editorial: Euro ganadería. 2007.

14- Ayora S, Lindgren PE Götz F. Biochemical properties of a novel metalloprotease from *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* involved in extracellular lipase processing. J Bacteriol. 1994; 176: 3218-3223

15- Baba E, Fukata T, Matsnmoto H. Ecological studies on coagulase-negative staphylococci in and around bovine udder. Bull. Osaka Ref. 1980; Ser B: 3259.

16- Baba T, Bae T, Schneewind O, Takeuchi F, Hiramatsu K. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: Polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. J. Bacteriol. 2008; 190: 300-310

17- Bager F, DANMAP: monitoring antimicrobial resistance in Denmark. Int. J.

Antimicrob. Agents. 2000; 14: 271-274.

18- Baird-Parker AC. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical test. J. Gen. Microbiol. 1963; 30: 409-427. Baird-Parker. The staphylococci and introduction. Journal of applied bacteriology symposium supplement. 1990: 69; 1-8.

19- Bannerman TL, Kleeman KT, Kloos WE. Evaluation of the Vitek Systems Gram-positive identification card for species identification of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 1322–1325.

20- Bannerman TL. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Tenover, RH Tenover (eds), Manual of Clinical Microbiology, American Society Microbiology, Washington, 2003; 384-404.

21- Barros EM, Iorio NL, Bastos MFB, Dos Santos KR, Giambiagi-deMarval M. Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis of a partial *groEL* gene sequence. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2007; 59: 157–251.

22- Beddi-Madani N, Greenland T, Richard Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. Vet. Microbiol. 1998; 59: 139-145

23- Bedolla CC, Castañeda VH, Wolter W. Métodos de detección de la mastitis bovina. RedVet. 2007. Revista electrónica de Veterinaria. VIII n°9:1695-7504

24- Bello C. Caracterización molecular de *Staphylococcus* coagulasa negativos aislados a partir de muestras de leche de origen bovino. Tesis de grado. Dpto. de Microbiología e Inmunología. Fac. de Cs. Exactas Fco. Qca. y Naturales. UNRC.

2009

- 25- Benites NR, Guerra JL, Melville PA, Da Costa EO. Etiology and histopathology of bovine mastitis of spontaneous occurrence. J. Vet. Med. 2002; B 49: 366-370.
- 26- Bengtsson B, Unnerstad Helle E, Ekman T, Artursson K, Nilsson-O" M. Persson Waller Karin. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. Veterinary Microbiology. 2009; 136: 142-149
- 27- Berglund C, Söderquist B. The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden-possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome *mec* between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect. 2008; 14: 1048-1056.
- 28- Bes M, Guérin-Faublée V, Meugnier H, Etienne J, Freney J. Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. Vet. Microbiol. 2000; 71: 287-294.
- 29- Blowey R, Edmondson P. Control de la Mastitis en Granjas de Vacuno de Leche. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. 1995.
- 30- Bjorland J, Steinum T, Kvitle B, Waage S, Sunde M, Heir E. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among Staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 4363-4368
- 31- Bochniarz M, Wawron W. Haemolytic and proteolytic activity of coagulase-negative staphylococci isolated from mastitis cows Polish Journal of Veterinary Sciences. 2012; 15: 61-65
- 32- Boddie R L, Nickerson S C, Owens W E, Watts J L. Udder microflora in nonlactating heifers. Agri-Practice. 1987; 8: 22-25.

- 33- Boddie RL, Nickerson SC, Adkinson R W. Efficacies of teat germicides containing 0.5% chlorhexidine and 1% iodine during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. J. Dairy Sci. 1997; 80: 2809-2814.
- 34- Boerlin P, Kuhnert P, Hüsey D, Schaellibaum M. Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 767-771.
- 35- Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM. Bergey's manual of systematic bacteriology, Second Edition, Volume 1 New York, USA. 2001
- 36- Bonetto C. *Staphylococcus* coagulasa negativos aislados a partir de tambos de la cuenca lechera de Villa María: prevalencia y susceptibilidad a antibióticos. Tesis de posgrado MSc. En Biotecnología UNRC. 2010.
- 37- Born AA, Fox LK, Leslie K E, Hogan JS, Andrew SM, Moyes KM, Oliver SP, Schukken YH, Hancock DD, Gaskins CT, Owens WE, Norman C. Effects of prepartum intramammary antibiotic therapy on udder health, milk production, and reproductive performance in dairy heifers. J Dairy Sci. 2006; 89: 2090-2098.
- 38- Botrel MA, Haenni M, Morignat E, Sulpice P, Madec JY, Calavas D. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhone-Alpes, France. Foodborn. Pathog. 2010; 7: 479-48
- 39- Bowden MGL, Visai CM, Longshaw KT, Holland P, Speziale MH. Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? J Biol Chem. 2002; 277: 43017-43023
- 40- Bradley AJ. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet. J. 2002; 164: 116-128.
- 41- Bramley A, Cullor J, Erskine R, Fox L, Harmon R, Hogan J, Nickerson S, Oliver

- S, Larry Smith K, Sordillo L. Current Concepts of Bovine Mastitis. 4th ed. 421 S. Nine Mound Rd. Verona, WI: National Mastitis Council Publications; 2003.
- 42- Bradley AJ, Leach K A, Breen JE, Green LE, Green MJ. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet. Rec. 2007; 160: 253-258.
- 43- Brinda M, Herman V, Fodor I. Phenotypic characterization of coagulase-negative staphylococci isolated mastitic milk in cows. Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară; 2010; Vol: XLIII .
- 44- Buchaman R, Gibbons, N, Williams C, Wilkins C. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Vol. I. II. Baltimore. 1996
- 45- Buelink D, Schaller A., Labriola S. Principales Cuencas Lecheras Argentinas Ed.Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2da edición-Octubre. 1996; pp 54.
- 46- Calvinho LF; Vitulich CA; Zurbriggen MA, Canavesio VR, Tarabia HD. Prevalencia de microorganismos patógenos de la ubre en rodeos de la cuenca lechera santafesina. Therios. 1991a; 10: 188-196.
- 47- Calvinho LF; Delgado AR; Vitulich CA; Occhi HL; Canavesio V, Zurbriggen M A, Tarabla HD. Susceptibilidad in vitro a los antimicrobianos de microorganismos aislados a partir de mastitis clínicas en tambos de la cuenca lechera santafesina. Vet. Arg. 1991b; 8: 677-680.
- 48- Calvinho LF, Tirante L. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en argentina en los últimos 25 años. Rev. FAVE, Sección Ciencias Veterinarias. 2005.
- 49- Capurro A, Artursson K, Persson Waller K, Bengtsson B, Ericsson-Unnerstad H,

Aspan A. Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and tuf gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of bovine mastitis. Vet. Microbiol. 2009; 134: 327-333.

50- Carretto E, Barbarini D, Couto I, De Vitis D, Marone P, Verhoef J, De Lencastre H, Briss S. Identification of coagulase-negative staphylococci other than *Staphylococcus epidermidis* by automated ribotyping. Clin. Microbiol. Infect. 2005; 11: 177-184.

51- Carrión G. M Principios básicos para el control de la mastitis y el mejoramiento de la calidad de la leche. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional de Michoacán. 2002; 6: 20, 55.

52- Chaffer M, Leitner G, Winkler M, Saran A. Coagulase *negative Staphylococcus intermedius* isolated from milk from dairy cows in Israel. Vet. Rec. 1998; 143: 592-593.

53- Castro, S. Bovinos. Pérdidas económicas por mastitis en tambos de Argentina. Animales XXI. Revista digital. [Online] <http://www.animalesxxi.com.ar/index.php/bovinos/382-perdidas-economicas-por-mastitis-en-tambos-de-argentina>.

54- Chaffer M, Leitner G, Winkler M, Glickman A, Krifucks O, Ezra E, Saran A. Coagulase negative staphylococci and mammary gland infections in cows. J. Vet. Med. B. 1999; 46: 707-712.

55- Chokr A, Watier D, Eleaume H, Pangon B, Ghnassia JC, Mack D, Jabbouri S. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. Int. J. Med. Microbiol. 2006; 296: 381-388.

- 56- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour L M, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J. Clin. Microbiol. 1985; 22: 996-1006.
- 57- Clarke SR; Foster SJ. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. Adv. Microb. Physiol. 2006; 51: 187-225.
- 58- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Vol. 28, No. 8. 3rd ed. Approved standard, M31-A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.
- 59- Compton CWR, Heuer C, Parker K, McDougall S. Epidemiology of Mastitis in Pasture-Grazed Peripartum Dairy Heifers and Its Effects on Productivity. J Dairy Sci. 2007; 90: 4157-70.
- 60- Compton CW, Heuer C, Parker K, McDougall S. Risk factors for peripartum mastitis in pasture-grazed dairy heifers. J. Dairy Sci. 2007; 90: 4171–4180.
- 61- Costerton JW; Stewart PS; Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284: 1318-22.
- 62- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect. Immun. 1999; 67: 5427-5433.
- 63- Cruz Alamilla M. La mastitis bovina y su impacto en la calidad de la leche. Entorno ganadero. 2007: 25.
- 64- Costa EO, Benites NR, Guerra JL, Melvilla PA. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy

cows. Zentbl. Veterinarmed. 2000; 47: 99-103.

65- Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, de Lencastre H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 3099-3103.

66- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J. Bacteriol. 2001; 183: 2888-2896.

67- Cucarella CM, Tormo A, Ubeda C, Trotonda MP, Monzon M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Role of biofilm-associated protein *bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 2004; 72: 2177-2185.

68- Cunha M, de Sinzato YK, Silveira L. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative *Staphylococcus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99: 855-860.

69- Cunha ML, Rugolo LM, Lopes CA. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101: 661-668.

70- DANMAP. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. [Online] http://www.danmap.org/pdfFiles/Danmap_2001.pdf 2001

71- Davidson TJ, Dohoo IR, Donald AW, Hariharan H, Collins K. A cohort study of coagulase negative staphylococcal mastitis in selected dairy herds in Prince-Edward-Island. Can. J. Vet. Res. 1992; 56: 275-280.

72- de Haas Y, Veerkamp RF, Barkema H W, Gröhn YT, Schukken YH. Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. J. Dairy Sci. 2004; 87: 95-105.

- 73- Deluyker HA, Van Oye SN, Boucher JF. Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. J. Dairy Sci. 2005; 88: 604-614.
- 74- de Silva GDI, Kantzanou MA, Justice RC, Wilkinson AR, Day NPJ, Peacock SJ. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 382-388.
- 75- De Vliegher SH, Laevens LA, Devriese G, Opsomer J, LLeroy M, Barkema HW, de Kruif A. Prepartum teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. Vet. Microbiol. 2003; 92: 245-252.
- 76- De Vliegher S, Opsomer G, Vanrolleghem A, Devriese LA, Sampimon OC, Sol J, Barkema HW, Haesebrouck F, de Kruif A.. In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. Veterinary Microbiology. 2004; 101: 215–221
- 77- De Vliegher S, Barkema HW, Stryhn H, Opsomer G, de Kruif A. First impact of early lactation somatic cell count in heifers on milk yield over the lactation. J. Dairy Sci. 2005; 88: 938-947.
- 78- Devriese LA. Identification of clumping-factor-negative staphylococci isolated from cows' udders. Res. Vet. Sci. 1979; 27: 313-320.
- 79- Devriese LA, De Keyser H. Prevalence of different species of coagulase negative staphylococci on teats and in milk from dairy cows. J. Dairy Res. 1980; 47: 155-158.
- 80- Devriese LA, Schleifer KH, Adegoke GO. Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. J. App. Bacteriol. 1985; 58: 45-55.

- 81- Devriese LA, Laevens H, Haesebrouck F, Hommez J. A simple identification scheme for coagulase negative staphylococci from bovine mastitis. Res.Vet. Sci. 1994; 57: 240–244.
- 82- Dieser S, Oddi T, Frigerio C, Bettera S, Bogni C, Odierno L, Bonetto C, Raspanti C. Conventional identification to the species level of coagulase negative *Staphylococcus* bovine strains. Arg. Biocell. 2009; 33: 148. ISSN: 0327-9545.
- 83- Donvito B, Etienne J, Greenland T, Mouren C, Delorme V, Vandenesch F. Distribution of the synergistic haemolysis genes *hld* and *slush* with respect to *agr* in human staphylococci. FEMS Microbiol. Lett. 1997; 151: 139-144.
- 84- Drancourt M, Raoult D. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 1333-1338.
- 85- Dubois D, Leyssene D, Chacornac JP, Kostrzewa M, Schmit PO, Talon R, Bonnet R, Delmas J. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 2010; 48: 941-945.
- 86- Errecalde JO. Uso de antimicrobianos en animales de consumo: Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. FAO. Producción y Sanidad. 2004. [Online] <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5468s00.pdf>
- 87- Erskine RJ, Walker RD, Bolin CA, Bartlett PC, White DG. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. J. Dairy Sci. 2002; 85: 1111-1118.
- 88- Erskine R, Cullor J, Schaellibaum M, Yancy B, Zecconi A. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antimicrobial drugs. Proceedings National Mastitis Council Annual Meeting. 2004. 400-414 .

- 89- Euzeby JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). 2011 [Online] <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>.
- 90- Faría Reyes JF, Valero-Leal K, D'pool G, García Urdaneta A, Allara Cagnasso M. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito.; Revista Científica. 2002:15
- 91- Farrell AM, Foster TJ, Holland KT. Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. J Gen Microbiol. 1993; 139: 267-277
- 92- Fessler AT, Billerbeck C, Kadlec K, Schwarz S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. J. Antimicrob. Chemoth. 2010; 65: 1576-1582.
- 93- Florentín Aponte CC. Perfil de resistencia *in vitro* a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2007; 5: 19-25.
- 94- Fontaine M, Perez Casal J, Song X, Shelford J, Willson P, Potter A. Immunization of dairy cattle with recombinant *Streptococcus uberis* GapC or a chimeric CAMP antigen confers protection against heterologous bacterial challenge. Vaccine. 2002; 20: 2278-2286.
- 95- Foret CJ, Owens WE, Boddie RL, Janowicz P. Efficacy of two iodine teat dips during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. J. Dairy Sci. 2003; 86: 3783-3786.
- 96- Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF. PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 877-880.

- 97- Freeman D, Falkiner F, Keane C. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J. Clin. Pathol. 1989; 42: 872-874.
- 98- Frigerio C, Bettera S, Scalise I, Giraudo J, Calzolari A. Resistencia a antibióticos de cepas de estafilococos aisladas entres tambos de Córdoba, Argentina. Rev. Med. Vet. 1995; 76: 288–292.
- 99- Gemmell CG. Extracellular toxins and enzymes of coagulase-negative staphylococci. En: Easmon, C.S.F.; Adlam, C. (eds). *Staphylococci and staphylococcal infections*. London. Academic Press; 1983; pp. 809-827.
- 100- Gemmell CG, Schumacher-Perdreau F. Extracellular toxins and enzymes elaborated by coagulase-negative staphylococci, (ed.), In P. A. Mardh and K. H. Schleifer Coagulase-negative staphylococci. Almquist and Wiksell, Stockholm. 1986; p.109-121
- 101- Gentilini E, Denamiel G, Llorente P, Godaly S, Rebuelto M, Degregorio O. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Dairy Sci. 2000; 83: 1224–1227
- 102- Gentilini E, Denamiel G, Betancor A, Rebuelto M, Rodriguez Fermepin M, De Torres RA. Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Argentina J. Dairy Sci. 2002; 85: 1913–1917
- 103- Geraghty L, Booth M, Rowan N, Fogarty A. Investigations on the efficacy of routinely used phenotypic methods compared to genotypic approaches for the identification of staphylococcal species isolated from companion animals in Irish veterinary hospitals. Irish Veterinary Journal. 2013; 66: 7
- 104- Ghebremedhin B, Layer F, König W, König B. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, 16S rRNA,

- hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. J. Clin. Microbiol. 2008; 46: 1019-1025.
- 105- Giannechini R, Concha C, Franklin A, Moreno-Lopez J. Estudio de susceptibilidad a diferentes agentes antimicrobianos de patógenos de la ubre aislados en rodeos lecheros de Uruguay. Jornada Internacional de Actualización de Mastitis, Buenos Aires, Argentina. 2002. [Online] <http://www.aprocal.com.ar>.
- 106- Gill R, Howard WH, Leslie K E, Lissemore K. Economics of mastitis control. J. Dairy Sci. 1990; 73: 3340-3348.
- 107- Gillespie BE, Oliver SP. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. J. Dairy Sci. 2005; 88: 3510–3518.
- 108- Gillespie BE, Headrick SI, Boonyayatra S, Oliver PS. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. Vet. Microbiol. 2009; 134: 65-72.
- 109- Giraudo J, Busso J. Etiología de mastitis bovina. Rev. de Med. Vet. (Bs. As.) 1980; 61: 43-47.
- 110- Goh SH, Potter S, Wood JO. Hemmingsen, SM., Reynolds, RP., Chow, AW. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase- negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 1996; 34: 818–823.
- 111- Gomes MJP. staphylococcus spp. in: labacvet microbiologia clínica 2007: [Online] <http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/staphylo.pdf>
- 112- González,R, Giraudo J, Busso J. Investigación de mastitis subclínicas: II Agentes etiológicos bacterianos. Rev. Med. Vet. (Bs. As.) 1980; 61: 225-234.
- 113- Gröhn Y, Wilson D, González R, Hertl J, Schulte H, Bennett G, Schukken Y.

- Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. J. Dairy Sci. 2004; 87: 3358-3374
- 114- Gutman G, Guiguet E, Rebolini J. Los ciclos en el complejo lácteo argentino. Análisis de políticas lecheras en países seleccionados. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Programa Calidad de los Alimentos Argentinos. 2003: 267.
- 115- Hagnestam-Nielsen C, Emanuelson U, Berglund BE. Strandberg. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. J. Dairy Sci. 2009; 92: 3124-3133.
- 116- Halasa T, Nielen M, De Roos APW, Van Hoorne R, de Jong GT, Lam GM, van Werven T, Hogeveen H. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. J. Dairy Sci. 2009; 92: 599-606.
- 117- Hans Andresen S. Mastitis: prevención y control. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2001
- 118- Harmon RJ, Langlois BE. Mastitis due to coagulase-negative species. Agripractice 1989; 10:29.
- 119- Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. J. Dairy Sci. 1994; 77:2103
- 120- Harmon RJ. Controlando la mastitis causada por patógenos contagiosos. In: Reunión Regional 1996 Consejo Nacional de Mastitis. Querétaro, MX. 26 Julio 1996. 1996
- 121- Hébert GA, Hancock GA.. Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. J Clin Microbiol. 1985; 22: 409-15.
- 122- Hébert GA, Crowder CG, Hancock GA, Jarvis WR, Thornsberry C.

Characteristics of coagulase-negative staphylococci that help differentiate these species and other Micrococcaceae. J. Clin. Microbiol. 1988; 26: 1939-1949.

123- Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 2286-2290.

124- Heir E, Sundheim G, Holck AL. Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. Int. J. Food Microbiol. 1999; 48: 211-219.

125- Hillerton JE, Berry EA. Treating Mastitis in The Cow-a Tradition or an Archaism. Journal of Applied Microbiology. 2005; 98:1250-1255.

126- Hoblet KH, Schnitkey GD, Arbaugh D, Hogan JS, Smith KL. Economics of clinical mastitis. 30th Annual Meeting NMC. Reno, Nevada, USA. National Mastitis Council (NMC). 1991; 24-30.

127- Hogan JS, White DG, Pankey JW. Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 1987; 70: 873-879.

128- Hogan JS, L. Smith K, Todhunter DA, Schoenberger PS. Efficacy of a barrier teat dip containing .55% chlorhexidine for prevention of bovine mastitis. J. Dairy Sci. 1995; 78: 2502-2506

129- Honkanen-Buzalski T, Myllys V, Pyörälä S. Bovine clinical mastitis due to coagulase-negative staphylococci and their susceptibility to antimicrobials. J. Vet. Med. 1994; B. 41:344-350. [Online] <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>

130- Hortet P, Seegers H. Calculated milk production losses associated with elevated somatic cell counts in dairy cows: Review and critical discussion. Vet. Res.

1998; 29: 497-510.

131- Hucker GJ. Genus I Micrococcus, in RS. Bread, EGD. Murray y A.D. Hitchens (eds), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 6 ed., The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1948;pp. 235-246.

132- Hussain A, Kairamkonda V, Jenkins DR. Successful treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a neonate using daptomycin. J Med Microbiol. 2011; 60: 381-3.

133- Hyvonen P, Kayhko S, Taponen S, von Wright A, Pyorala S. Internalization by mammary epithelial cells of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. Proceedings of the Heifer Mastitis Conference 2007, Ghent, Belgium. 2007; 42-43.

134- Hyvönen P, Käyhkö S, Taponen S, von Wright A, Pyörälä S. Effect of bovine lactoferrin on the internalization of coagulase-negative staphylococci into bovine mammary epithelial cells under in-vitro conditions. J. Dairy Res. 2009; 76: 144-151.

135- Ibrahem S, Salmenlinna S, Virolainen A, Kerttula AM, Lyytikäinen O, Jägerroos H, Broas M, Vuopio-Varkila J. Carriage of methicillin-resistant staphylococci and their SCCmec types in a long-term-care facility. J. Clin. Microbiol. 2009; 47: 32-37.

136- Ieven M, Verhoeven J, Pattyn SR, Goossens H. Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 1060-1063.

137- Imran M, Sajjad UR, Muhammad A, Murtazul H, Aaysha R, Manzoor H. Methicillin resistant status of *Staphylococcus* species isolated from mastitic bovines. Vet Scan. 2010; 5: 29

138- Jain N. Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. J.

Dairy Sci.1979; 62: 128-134.

139- Janosi S, Baltay Z. Correlations among the somatic cell count of individual bulk milk, result of the California Mastitis Test and bacteriological status of the udder in dairy cows. Acta Vet Hung. 2004; 52: 173-83.

140- Jarp J. Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. Vet. Microbiol. 1991; 27: 151-158

141- Jasper DE, Jain NC. Hemolytic behavior of staphylococci isolated from cows' milk. Can. J. Comp. Med.Vet. Sci. 1966; 30: 63-70.

142- Klingenberg C, Ronnestad A, Anderson AS, Abrahamsen TG, Zorman J, Villaruz A, Flaegstad T, Otto M, Sollid JE. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. Clin. Microbiol. Infec. 2007; 13: 1100-1111.

143- Kloos WE, Schleifer KH. Isolation and characterization of staphylococci From human skin. II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*. Int. J.Syst. Bacteriol. 1975; 25: 62-79.

144- Kloos WE, Schleifer KH. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. J. Clin. Microbiol. 1975; 1: 82-88

145- Kloos WE, Schleifer K. Genus IV *Staphylococcus* Rosenbach 1884. Bergey's manual of determinative bacteriology, vol 2. P.H.A. Sneath Céd. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.1986; pp.1013-1035.

146- Kloos WE, Bannerman T. L. Update on clinical significance of coagulase negative staphylococci. Clin Microbiol Rev. 1994; 7:117-140.

147- Koenig MG; Melly MA. The importance of surface antigens in staphylococcal

virulence. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1965; 128: 231-250

148- Koivula M, Pitkälä A, Pyörälä S, Mäntysaari E. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. Acta Agric. Scand. A. 2007; 57: 89-96.

149- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn W. C.Diagnóstico Microbiológico, 5.^a ed. Médica Panamericana, 1999. pp. 528-9.

150- Koneman E, Allen S. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color. Médica Panamericana. ISBN: 9500608952. 2008

151- Kudinha T, Simango C. Prevalence of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis in Zimbabwe. J S Afr Vet Assoc. 2002; 73: 62-65.

152- Kuroishi T, Komine K, Kai K, Itagaki M, Kobayashi J, Ohta M, Kamata S. Kumagai K. Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretions, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. J. Vet. Med. Sci. 2003; 65: 899-906.

153- Kwok AY, Su RP, Reynolds Bay SJ, Av-Gay Y, Dovichi NJ, Chow A W. Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1999; 49: 1181–1192.

154- Kwok AYC, Wilson JT, Coulthart M, Mutharia L, Chow AW .Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial hsp60 gene sequences. Can. J. Microbiol. 2002; 48: 903–910.

155- Kwok AYC, Chow AW. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.2003; 53: 87–92.

- 156- Lan R, Reeves PR. 2001. When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics. Trends Microbiol. 2006; 9: 419–424.
- 157- Langlois BE, Harmon. RJ. Use of lysostaphin and bacitracin susceptibility for routine presumptive identification of staphylococci of bovine origin. J. Food Protect. 1988; 51: 24-28.
- 158- Laport MS, Marinho PR, Santos OC, de Almeida P, Romanos MT, Muricy G, Brito MA, Giambiagi-deMarval M. Antimicrobial activity of marine sponges against coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. Vet Microbiol. 2012; 155: 362-8
- 159- Lee MK, Park AJ. Rapid species identification of coagulase negative Staphylococci by rRNA spacer length polymorphism analysis. J. Infect. 2001; 42: 189–194.
- 160- Leigh J. Proceedings of the British Mastitis Conference. Institute for Animal Health. 2003; 15-22.
- 161- León B. Frecuencia de aislamiento de los principales agentes de mastitis en el sur de Chile. II Seminario Calidad de Leche Bovina. Osorno, Chile. 15-16 Julio 1997. Colegio Médico Veterinario de Chile. Consejo Regional Osorno. 1997; pp. 34-44.
- 162- Lim GH, Leslie KE, Kelton DF, Duffield TF, Timms LL, Dingwell RT. Adherence and efficacy of an external sealant to prevent new intramammary infections in the dry period. J. Dairy Sci. 2007; 90: 1289-1300.
- 163- López Meza J, Higuera Ramos J, Ochoa Zarzosa A, Chassin Noria O, Valdez Alarcón J, Bravo Patiño A, Baizabal Aguirre V. Molecular characterization

- of *Staphylococcus* spp. isolates associated with bovine mastitis in Tarímbaro, Michoacán, Tec Pecu Mex. 2006; 44: 91-106
- 164- Lu T, Park JY, Parnell K, Fox LK, McGuir MA. Characterization of fatty acid modifying enzyme activity in staphylococcal mastitis isolates and other bacteria BMC Research Notes. 2012; 5: 323
- 165- Luthje P, Schwarz S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide lincosamide resistance phenotypes and genotypes. J. Antimicrob. Chemother. 2006; 57: 966–969.
- 166- Ma Y, Ryan C, Barbano DM, Galton DM, Rudan MA, Boor KF. Effects of somatic cell count of quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. J. Dairy Sci. 1999; 83: 264-274.
- 167- Mack DM, Haeder N. Siemssen, Laufs R. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. J. Infect. Dis. 1996; 174: 881-884
- 168- Madigan MT, Martinko JM, Parker J, Sánchez Pérez M. “Brock”: Biología De Los Microorganismos”. 10 Ed. Editorial: Pearson, 2003: Pag. 384-388
- 169- Maes NY, De Gheldre R, DeRyck M, Vanechoutte H, Meugnier J, Etienne M, Struelens J. Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* species by tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 2477–2481.
- 170- Magnano V. Identificación a nivel de especie y prueba de sensibilidad a antibióticos de cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativos aisladas de mastitis bovina. Tesis de grado. Dpto. de Microbiología e Inmunología. Fac. de Cs. Exactas

Fco. Qca. y Naturales. UNRC. 2009

171- MARAN. Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands. 2003; [Online] <http://www.cidc-elystad.wur.nl/UK/publications/>. 169-

Martel JL., Tardy FA. Brisabois A, Lailier R, Coudert M. Chaslusdancula E. The French antibiotic resistance monitoring programmes. Int. J. Antimicrob. Agents. 2000;14: 275-283.

172- Marques VF, de Souza MMS, de Mendonça ECL, de Alencar TA, Pribul BR, Coelho Shana MO, Lasagno M, Reinoso EB. *Análise fenotípica e genotípica da virulência de Staphylococcus spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina* Pesq. Vet. Bras. 2013; 33(2): 161-170.

173- Matthews KR, Harmon RJ, Smith BA. Protective effect of *Staphylococcus chromogenes* infection against *Staphylococcus aureus* infection in the lactating bovine mammary gland. J. Dairy Sci. 1990; 73: 3457-3462.

174- Matthews KR., Harmon RJ, Langlois BE. Effect of naturally occurring coagulase-negative staphylococci infections on new infections by mastitis pathogens in the bovine. J. Dairy Sci. 1991; 74: 1855-1859.

175- Matthews K, Harmon R, Langlois B. Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. J. Dairy Sci. 1992; 75: 1835-1839.

176- Matos JS, White DG, Harmon RJ, Langlois BE. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. J. Dairy Sci. 1991; 74: 1544-1549.

177- McDonald JS. Streptococcal and staphylococcal mastitis. Vet Clin North Am Large Anim Pract. 1984; 2: 269-285.

- 178- McDougall SM. Efficacy of two antibiotic treatments in curing clinical and subclinical mastitis in lactating dairy cows. *New. Z. Vet. J.* 1998; 46: 226-232.
- 179- McDougall S, Arthur DG, Bryan MA., Vermunt JJ, Weir AM. Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. *New. Z. Vet. J.* 2007; 55: 161-70.
- 180- Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *Vet. J.* 2006; 171: 398-407.
- 181- Mellmann A, Becker K., von Eiff C, Keckevoet U, Schumann P, Harmsen D. Sequencing and staphylococci identification. *Emerg. Inf. Dis.* 2006; 12: 333–336.
- 182- Middleton JR, Timms LL, Bader GR, Lakritz J, Luby CD, Steevens BJ. Effect of prepartum intramammary treatment with pirlimycin hydrochloride on prevalence of early first-lactation mastitis in dairy heifers. *J Am Vet Med Assoc.* 2005; 227: 1969-1974.
- 183- Mikkonen TP, Kärenlampi RI, Hänninen ML. Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004; 54: 753–758.
- 184- Milne M, Nolan A, Cripps P, Friton G, Fitzpatrick J. Assessment of pain in dairy cows with clinical mastitis. *Proceedings of XXIII World Buiatrics Congress, Quebec, Canadá 2004.* p. 167.
- 185- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP).. Lechería.2012. [Online] <http://www.minagri.gob.ar/>
- 186- Moliby R. Isolation and properties of membrane damaging toxins, In C. S. F. Easmon and C. Adlam (ed.), *Staphylococci and staphylococcal infections.* Academic Press, Inc., New York. 1983: 619-669.

- 187- Monardes H; Barria N. Recuento de células somáticas y mastitis. Tecno Vet. Año 1, Marzo 1995 [Online] http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_
- 188- Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L, Borsetti E. Presence and expression of collagen adhesin gene (cna) and slime production in *Staphylococcus aureus* strains from orthopaedic prosthesis infections. Biomaterials. 1999; 20: 1945-1949.
- 189- Moon JL, Banbula A, Oleksy A, Mayo JA, Travis J. Isolation and characterization of a highly specific serine endopeptidase from an oral strain of *Staphylococcus epidermidis*. Biol Chem. 2001; 382: 1095-1099
- 190- Moretro T, Hermansen, L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K, Langsrud S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus ica, among staphylococci from food and food processing environments. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69: 5648-5655.
- 191- Morosini MI, Cercenado E, Ardanuy C, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos Gram positivos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012; 30(6): 325-332
- 192- Myllys V. Staphylococci in heifer mastitis before and after parturition. J. Dairy Res. 1995; 62: 51-60.
- 193- Myllys V, Asplund K, Brofeldt E, Hirvela-Koski V, Honkanen-Buzalski T, Junttila J, Kulkas, L, Myllykangas O, Niskanen M, Saloniemi H, Sandholm M, Saranpää. T Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995 - Changes in prevalence and antimicrobial resistance. Acta. Vet. Scand. 1998; 39: 119-126.
- 194- Nascimento JDS, Fagundes PC, Brito MAVD, dos Santos KRN, Bastos MDD. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. Vet. Microbiol. 2005; 106: 61-71.

- 195- National Mastitis Council. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. Inc., Arlington, VA, USA. 4th Edition. 2004; 1-47.
- 196- National Mastitis Council. Recommended mastitis control program, National Mastitis Council Inc., Madison, WI. 2009 [Online] <http://www.nmconline.org/docs/NMCchecklistInt.pdf>
- 197- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS: Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 2nd edn. Approved standard. 2002. Document M31-A2. NCCLS, Wayne, PA, USA.
- 198- Nemati M, Hermans K, Vancraeynest D, De Vliegher S, Sampimon OC, Baele M, De Graef EM, Pasmans F, Haesebrouck F. Screening of bovine coagulase negative staphylococci from milk for superantigen-encoding genes. Vet. Rec. 2008; 163: 740-743.
- 199- Nevala M, Taponen S, Pyörälä S. Bacterial etiology of bovine clinical mastitis—Data from Saari Ambulatory Clinic in 2002–2003. Suomen Eläinlääkärilehti. 2004; 110: 363–369.
- 200- Nickerson SC, Boddie RL. Effect of naturally occurring coagulase-negative staphylococcal infections on experimental challenge with major mastitis pathogens. J. Dairy Sci. 1994; 77: 2526-2536.
- 201- Nickerson SC, Owens WE, Boddie RL. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. J. Dairy Sci. 1995; 78: 1607-1618.
- 202- NORM-VET, 2005. Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway, 2006. [Online] <http://www.vetinst.no/Arkiv/>

Zoonosesenteret/NORM_NORM-VET_2005.pdf>

203- Oddi T. Frecuencia de aislamiento de *Staphylococcus* coagulasa negativos a partir de leche de tambos de la cuenca lechera de Villa María: identificación e incidencia en la mastitis bovina. Tesis de grado. Dpto. de Microbiología e Inmunología. Fac. de Cs. Exactas Fco. Qca. y Naturales. UNRC. 2008

204- O'Gara, JP, Humphreys H, *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. J. Med. Microbiol. 2001; 50: 582-587.

205- Ohara-Nemoto Y Ikeda Y, Kobayashi MSasaki M. Tajika S. & Kimura S. Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. Microb Pathog. 2002; 33, 33-41

206- Ohshima Y; Schumacher Perdreau F; Peters G; Pulverer G. The role of capsule as a barrier to bacteriophage adsorption in an encapsulated *Staphylococcus simulans* strain. Med. Microbiol. Immunol.1988; 177: 229-233.

207- OIE. Mesa de la Comisión de Normas Sanitarias de la OIE para los Animales Terrestres.2004.[Online]http://www.oie.int/TAHSC/esp/Informes/E_SCCDJULY2004.pdf

208- Olde Riekerink R, Barkema H, Veenstra W, Berg F, Stryhn H, Zadoks N. Somatic Cell Count During and Between Milkings. J. Dairy Sci. 2007; 90: 3733-3741

209- Oliver S.P., Mitchell, B. A. Intramammary infections in primigravid heifers near parturition. J. Dairy Sci. 1983; 66: 1180-1183.

210- Oliver SP, Sordillo LM. Udder health in the periparturient period. J Dairy Sci. 1988; 71: 2584-2606.

- 211- Oliver SP, Jayarao BM. Coagulase-negative staphylococcal intramammary infections in cows and heifers during the nonlactating and periparturient periods. J. Vet. Med. 1997; 44: 355-363.
- 212- Oliver SP, Gillespie BE, Ivey SJ, Lewis MJ, Johnson DL, Lamar KC, Moorehead H, Dowlen HH, Chester ST, Hallberg J. WInfluence of prepartum pirlimycin hydrochloride or penicillin novobiocin therapy on mastitis in heifers during early lactation. J. Dairy Sci. 2004; 87: 1727-1731.
- 213- Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F Vilela CL. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. Vet. Microbiol. 2006; 118: 133-140.
- 214- Onni T, Sanna G, Cubeddu GP, Marogna G, Lollai S, Leori G, Tola S. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and *gap* genes. Vet. Microbiol. 2010; 144: 347-352.
- 215- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Mesa de la Comisión de Normas sanitarias de la OIE para los animales terrestres. 2004. [Online] http://www.oie.int/TAHSC/esp/Informes/E_SCCDJULY2004.pdf.
- 216- Östensson K, Hageltorn M, Astrom G. Differential cell counting in fraction-collected milk from dairy cows. Acta Vet. Scand. 1988; 29: 493-500.
- 217- Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 322: 207-228.
- 218- Owens WE, Ray CH, Watts JL, Yancey RJ. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. J. Dairy Sci. 1997; 80: 313-317.

- 219- Pankey JW, Drechsler PA. Y Wildman EE. Mastitis prevalence in primigravid heifers at parturition. J Dairy Sci. 1991; 4: 1550-1552.
- 220- Paradis, ME, Bouchard E, Scholl DT, Miglior F, Roy JP. Effect of nonclinical *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative staphylococci intramammary infection during the first month of lactation on somatic cell count and milk yield in heifers. J. Dairy Sci. 2010; 93: 2989-2997.
- 221- Parker KI, Compton C, Anniss FM, Weir A, Heuer C, Mc Dougall S. Subclinical and clinical mastitis in heifers following the use of a teat sealant precalving. J. Dairy Sci. 2007; 90: 207-218.
- 222- Park JY, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa FR, Sisch, WM Bohach. GA. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. Vet. Microbiol. 2011a; 147: 142-148.
- 223- Park JY, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa, FR, Sisch WM and Bohach GA. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. Vet. Microbiol. 2011b; 147:149-154.
- 224- Pate M, Zdovc I, Avberšek J, Ocepek M, Pengov A, Podpečan O. Coagulase-negative staphylococci from non-mastitic bovine mammary gland: characterization of *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus haemolyticus* by antibiotic susceptibility testing and pulsed-field gel electrophoresis. J Dairy Res. 2012; 79: 129-

- 225- Persson Waller KA, Aspan A. Nyman Y, Persson, U, Grönlund Andersson. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. Vet. Microbiol. 2011; 152: 112-116
- 226- Philpot, W. N. Economic of mastitis. Vet Clin North Am Large Anim. Pract. Jul. 1984; 6: 233-45.
- 227- Philpot WN, Nickerson, S. Mastitis: El contraataque. Surge International Babson Bros Ed., III. 1993, USA.
- 228- Philpot, N. Importancia de la cuenta de células somáticas y los factores que la afectan. III Congr. Nac. de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. 2001. León, Gto. México.
- 229- Piepers S, De Vliegher S, de Kruif A, Opsomer G, Barkema HW. Impact of intramammary infections in dairy heifers on future udder health, milk production, and culling. Vet. Microbiol. 2009a; 134: 113-120.
- 230- Piepers S, Opsomer, G, Meyer E, Demeyere K, Barkema HW, de Kruif A, De Vliegher S. Heifer and quarter characteristics associated with periparturient blood and milk neutrophil apoptosis in healthy heifers and in heifers with subclinical mastitis. J. Dairy Sci. 2009b; 92: 4330-4339.
- 231- Piepers SO, Opsomer G, Barkema HW, de Kruif A, De Vliegher S. Heifers infected with coagulase-negative staphylococci in early lactation have fewer cases of clinical mastitis and higher milk production in their first lactation than non-infected heifers. J. Dairy Sci. 2010a; 93: 2014-2024.
- 232- Piepers OC, Sampimon RN, Zadoks P, De Vos, F. Haesebrouck. *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010b; 60: 2739-2744

- 233- Piepers S, Peeters K, Opsomer G, Barkema H. W. Frankena K, De Vliegher S.. Pathogen group specific risk factors at the herd, heifer and quarter level for intramammary infections in early lactating dairy heifers. *Prev. Vet. Med.* 2011; 99: 91-101.
- 234- Piessens V, Van Coillie E, Verbist B, Supré K, Braem G, Van Nuffel A, De Vuyst L, Heyndrickx M, De Vliegher S. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *J. Dairy Sci.* 2011; 94: 2933-2944.
- 235- Piessens V, De vliegher S, Verbist B, Braem G, Van nuffel A, De vuyst L, Heyndrickx M, van Coillie E, Characterization of coagulase-negative staphylococcus species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips *J. Dairy Sci.* 2012; 95: 7027–7038
- 236- Pitkälä, A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland – Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 2004; 87: 2433-2441.
- 237- Planchon S, Gaillard-Martinie B, Dordet-Frisoni E, Bellon-Fontaine M.N, Leroy, S, Labadie J, Hebraud M, Talon R. Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Food Microbiology.* 2006; 109: 88–96.
- 238- Poelarends JJ, Hogeveen H, Sampimon OC, Sol J. Monitoring subclinical mastitis in Dutch dairy herds. *Proc. 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality*, Vancouver, BC, Canada: 2001; 466: 145-149
- 239- Potter, A. Vaccines for streptococcal pathogens have arrived. *NMC Annual Meeting Proceedings.* 2002; pp. 81.

- 240- Poyart C, Quesne G, Boumaila C, Trieu-Cuot P. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 4296-4301
- 241- Pyörälä S, Syväjärvi J. Bovine acute mastitis. Part I. Clinical aspects and parameters of inflammation in mastitis caused by different pathogens. J. Vet. Med. B1987; 34: 573-584.
- 242- Pyörälä S, Pyörälä E. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989- 1995). J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998; 212: 407-412.
- 243- Pyörälä S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. Vet. Microbiol. 2009; 134: 3–8.
- 244- Qoronfleh MW, Streips U, Wilkinson B. Basic features of the staphylococcal heat shock response. Antonie Leeuwenhoek. 1990; 58: 79-86.
- 245- Quirk T, Fox LK, Hancock DD, Capper J, Wenz J, Park J. Intramammary infections and teat canal colonization with coagulase-negative staphylococci after postmilking teat disinfection: Species-specific responses Dairy Sci. 2012; 95: 1906–1912.
- 246- Rainard P, Ducelliez M, Poutrel B. The contribution of mammary infections by coagulase-negative staphylococci to the herd bulk milk somatic cell count. Vet. Res. Comm. 1990; 14: 193-198.
- 247- Rajala-Schulz PJ, Smith KL, Hogan JS, Love BC. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. Vet. Microbiol. 2004; 102: 33-42.

- 248- Rajala-Schultz PJ, Torres AH, DeGraves FJ, Gebreyes WA, Patchanee P. Antimicrobial resistance and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci over the dry period. *Vet. Microbiol.* 2009; 134: 55–64.
- 249- Rampone H, Bogni C, Giraudo J, Calzolari A. Identification of staphylococci from bovine milk in Argentina. *Zbl. Bakt.* 1993; 279: 537-543.
- 250- Ratafia M. Worldwide opportunities in genetically engineered vaccines. *Biotechnology.* 1987; 5: 1154-1156
- 251- Reneau J, Packard V. Monitoring mastitis, milk quality, and economics losses in dairy fields. *Dairy Food Environ. Sanit.* 1991; 11: 4-11.
- 252- Rivero, V.B.; Vena, M.M. Y Corbellini, C.N.. Resultados bacteriológicos en casos de mastitis clínicas en rodeos lecheros de la cuenca de Abasto del Gran Buenos Aires. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 1984; 4: 211-223.
- 253- Rohde H; Kalitzky M, Kröger N; Scherpe S; Horskotte MA.; Knobloch JKM; Zander A.R; Mack D. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J. Clin Microbiol.* 2004; 42: 5614-5619.
- 254- Rosenstein R, Götz F. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie.* 2000; 82: 1005-1014.
- 255- Rosenbach C, Kloos WE, Schleifer K. Genus IV *Staphylococcus*. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, vol 2. P.H.A. Sneath Cédí. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1984: 1013-1035.
- 256- Ruegg, P. L. 2009. The quest for the perfect test: phenotypic versus genotypic identification of coagulase-negative staphylococci associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 134(1-2): 15-19.

- 257- Sansano C. Mastitis bovina causada por ECN. Sitio argentino de producción animal. 2010; [Online] <http://www.produccion-animal.com.ar>.
- 258- Sandgren CH, Waller KP, Emanuelson U. Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. *Veterinary Journal*. 2008; 175: 108-117.
- 259- Sampimon O, Barkema HW, Berends I, Sol J, Lam T. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. *J. Dairy Res*. 2009a; 76: 129-136.
- 260- Sampimon OC, Barkema HW, Berends IMGA, Sol J, Lam TJGM. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Vet. Microbiol*. 2009b; 134: 37-44.
- 261- Sampimon OC, Zadoks RN, De Vliegher S, Supre K, Haesebrouck F, Barkema HW, Sol J, Lam TJGM. Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Vet. Microbiol*. 2009c; 136: 300-305.
- 262- San Martín B, Kruze J, Morales M, Agüero H, León L, Espinoza S, Iragüen D, Puga J, Borie C. Bacterial resistance of mastitis pathogens isolated from dairy cows in the Vth Region, Metropolitan Region and Xth Region, Chile. *Arch. Med.Vet*. XXXIV, N° 2, 2002
- 263- Santos da Silva OC, Barros EM, Brito Paiva Vasconcelos MA, Bastos MFB, Dos Santos KR, Giambiagi-deMarval M. Identification of coagulase negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the *groEL* gene. *Vet. Microbiol*. 2008; 130: 134-140.

- 264- Sawant AA, Gillespie BE, Oliver SP. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. Vet. Microbiol. 2009; 134: 73-81
- 265- Sbodio OA., García de Marangnon S, Terenzani S, Freyre MR, Romano, L, Sabbag, N. Contenido de Ca, Mg, Na, K y P en leches normales y patológicas. Revista del I.T.A. 1981; 3.
- 266-.Scheifele DW, Bjornson GL, Dyer RA, Dimmick JE. Delta-like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. Infect Immun. 1987; 55: 2268-73
- 267- Schukken YH, Van de Geer D, Grommers FJ, Smit JA, Brand A. Intramammary infections and risk factors for clinical mastitis in herds with low somatic cell counts in bulk milk. Vet. Rec. 1989; 125: 393-396.
- 268- Schukken YH, Gonzalez RN, Tikofsky LL, Schulte HF, Santisteban, CG. Welcome F. L, Bennett G. J., Zurakowski M. J., and. Zadoks R. N. CNS mastitis: Nothing to worry about? Vet. Microbiol. 2009; 134: 9-14.
- 269- Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, Gastra W. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. J. Antimicrob. Chemoth. 2010; 65: 601-604.
- 270- Sears P, González R, Wilson D, Han H. Procedures for mastitis diagnosis and control. Vet. Clin. North America: Food Animal Practice. 1993; 9: 445-468.
- 271- Seki K, Okasawara M, Sakurada J, Maurai M, Masura S. Altered F. Virulence of a pleiotropic *Staphylococcus aureus* mutant with low producibility of coagulase and others factors in mice. Inmul. 1987; 33: 981-990.

- 272- Seo YS, Lee DY, Rayamahji N, Kang ML, Yoo HS. Biofilmforming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. *Research in Veterinary Science*. 2008; 85: 433–438.
- 273- Shah MM, Iihara H, Noda M, Song SX, Nhung PH, Ohkusu K, Kawamura Y, Ezaki T. *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007; 57:25–30
- 274- Simojoki H, Orro T, Taponen S, Pyörälä S. Host response in bovine mastitis experimentally induced with *Staphylococcus chromogenes*. *Vet Microbiol.* 2009; 134:95-99.
- 275- Simojoki H, Salomäki T, Taponen S, Iivanainen A, Pyörälä S. Innate immune response in experimentally induced bovine intramammary infection with *Staphylococcus simulans* and *S. epidermidis*. *Vet. Res.* 2011; 42.
- 276- Simojoki H, Hyvonen P, Ferrer C, Plumet, Taponen S, Pyörälä S. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet. Microbiology* 2012; 158: 344–352
- 277- Sivadon V, Rottman M, Chaverot, S, Quincampoix JC, Avettand V, de Mazancourt P, Bernard L, Trieu-Cuot P, Feron JM, Lortat-Jacob A, Piriou P, Judet T, Gaillard JL. Use of genotypic identification by *sodA* sequencing in a prospective study to examine the distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species among strains recovered during septic orthopedic surgery and evaluates their significance. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 2952-2954.

- 278- Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Dowson CG. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolated from high-somatic-cell-count cows and the environment of an organic dairy farm in the United Kingdom. J Clin Microbiol. 2005; 43: 4731-6
- 270- Smith KL, Hogan, JS. . The world of mastitis. Proc. 2nd Intern. Symp. Mastitis and Milk Quality. 2001, Vancouver, British Columbia, Canada:1-12
- 280- Soares LC, Pereira IA, Pribul BR, Oliva MS, Coelho SMO, Souza MMS. Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. Pesq. Vet. Bras. 2012; 32(8): 692-696
- 281- Spargser J, Wieser M, Täubel M, Rosselló-Mora RA, Rosengarten R, Busse HJ. *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53: 2007-2011
- 282- Sprong RC, Hulstein MF, Van der Meer. Bactericidal activities of milk lipids. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 1298-301
- 283- Stepanovic S., Vukovic D., Savic M. Sí vabic-Vlahovic, M. *Staphylococcus sciuri* recommendation for simple identification. New Microbiol. 2000; 23: 201-205
- 284- Stepanovic S , Vukovic D, Hola V, Giovanni B, djukic S , Irkovic ivana y Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci APMIS. 2007; 115: 891-899.
- 285- Stevens NT, Tharmabala M, Dillane T, Greene CM, O'Gara JP, Humphreys. H. Biofilm and the role of the *ica* operon and *aap* in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing neurosurgical meningitis. Clin. Microbiol. Infect. 2008; 14: 719-722.

- 286- Struelens M. Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM) of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID),. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin. Microbiol. Infect.1996; 2: 2-11.
- 287- Sordelli DO, Buzzola FR, Gomez MI, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Catalano M., Reitz AJ, Tollersrud T, Denamiel G, Jeric, P, Lee J.C. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 846-850.
- 288- Supré K, De Vlieghe S, Sampimon OC, Zadoks RN, Vaneechoutte M, Baele M, De Graef E, Piepers S, Haesebrouck F. Technical note: Use of transfer RNA-intergenic spacer PCR combined with capillary electrophoresis to identify coagulase-negative *Staphylococcus* species originating from bovine milk and teat apices. J. Dairy Sci. 2009; 92: 3204-3210.
- 289- Supré K, Haesebrouck F, Zadoks RN, Vaneechoutte M, Piepers S, De Vlieghe S. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. J. Dairy Sci. 2011; 94: 2329-2340.
- 290- Suriyasathaporn W, Schukken, Y, Nielen M, Brands A. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. J. Dairy Sci. 2000; 83: 1248-1255.
- 291- Takahashi T, Kaneko M, Mori Y, Tsuji M, Kikuchi N, Hiramune T. Phylogenetic analyses of *Staphylococcus* based on the 16S rDNA sequence and assignment of clinical isolates from animals. J. Vet. Med. Sci. 1997; 59: 775-783.

- 292- Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen HD, Pyörälä S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet. Microbiol.* 2006; 115: 199–207.
- 293- Taponen S, Koort J, Bjorkroth J, Saloniemi H, Pyörälä S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. *J. Dairy Sci.* 2007; 90: 3301– 3307.
- 294- Taponen, S. Bovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci. Tesis Doctoral. Department of Production Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine. University of Helsinki Finland. 2008.
- 295- Taponen S, Pyörälä S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*?. *Vet Microbiol.* 2009; 134: 29-36.
- 296- Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.* 2006; 89: 2542-2551.
- 297- Teng, L. J., Hsueh, P. R., Wang, Y. H., Lin, H. M., Luh, K. T., Ho, S. W. Determination of *Enterococcus faecalis* *groESL* full-length sequence and application for species identification. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 3326–3331.
- 298- Tessi M; De Esponda R, Sabbatini De Comini L, Giavedoni De Taher M, Paura A, Moguilevsky M, Casado N, Romano L, Weidmann P. Etiología microbiana de mastitis bovina subclínica en la cuenca lechera santafesina. *Rev. Arg. Microbiol.* 1979; 11: 49–56

- 299- Tessi MA, Comini LS, Esponda RA, Taher MDG, Paura A, Moguilevsky MA, Casado N, Silva MCT. Evaluación de la calidad microbiológica de leche cruda. *Revista del I.N.T.A.* 1981; 3: 115-127.
- 300- Teufel P, Götz F. Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 1993; 175, 4218-4224
- 301- Thornsberry C, Burton PJ, Yee YC, Watts JL, Yancey RJ. The activity of a combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens: development of a disk diffusion test. *J Dairy Sci.* 1997; 80: 413-421.
- 302- Thorberg BM., Brändström B. Evaluation of two commercial systems and a new identification scheme based on solid substrates for identifying coagulase negative staphylococci from bovine mastitis. *J. Vet. Med. B.* 2000; 47: 683-691.
- 303- Thorberg BM, Kühn I, Aarestrup FM, Brändström B, Jonsson P, Danielsson-Tham M. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet. Microbiol.* 2006; 115: 163-172.
- 304- Thorberg B, Danielsson-Tham M, Emanuelson, U, Persson Waller K. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Sci.* 2009; 92: 4962-4970.
- 305- Timms LL, Schultz LH. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 1987; 70: 2648-2657.
- 306- Todhunter DA, Cantwell LL, Smith KL, Hoblet KH, Hogan JS. Characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Vet. Microbiol.* 1993; 34: 373-380.

- 307- Tormo MA, Knecht E, Gotz F, Lasa M, Penades JR. *Bap*-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? Microbiol. -Sgm 2005; 151: 2465-2475.
- 308- Tremblay YDN, Lamarche D, Chever P, Haine D, Messie S, Jacques M. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms J. Dairy Sci. 2013; 96: 234–246.
- 309- Trinidad P, Nickerson SC, Adkinson, RW. Histopathology of staphylococcal mastitis in unbred dairy heifers. J. Dairy Sci. 1990; 3: 639–647.
- 310- Tu Quoc P; Genevaux P; Pajunen M; Savilahti H; Georgopoulos C; Schrenzel J, Kelley W.L. Isolation and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 2007; 75: 1079-1088.
- 311- Türkyilmaz S, Kaya O. Determination of some Virulence Factors in *Staphylococcus* spp. Isolated from various clinical samples. Turk J Vet Anim Sci. 2006; 30: 127-132.
- 312- van den Borne BH, Sampimon OC, Zadoks RN, Nielen M, van Schaik G, Lam TJ. Coagulase-negative staphylococci: A pilot study on species differences in bacteriological cure and somatic cell count. Page 41 in Seminar on Coagulase-Negative Staphylococci in the Bovine, Ghent, Belgium. 2010
- 313- Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet. Microbiol. 2003; 92: 179-185.
- 314- Vautor E, Abadie G, Pont A. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. Vet Microbiol. 2008; 18: 407-411.

- 315- Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Meugnier H, Bes M, Lasne Y, Fiedler F, Etienne J, Freney J. *Staphylococcus fleuretti* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000; 50: 1521–1527.
- 316- Vibeke TR. The Microbial Threat. Copenhagen, Denmark. Report from the Invitational EU Conference. 1998
- 317- Vignoli R, Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Capítulo de libro Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2008; 753 -
- 318- Vissio C, Dieser SA, Raspanti CG, Giraudo JA, Bogni CI, Odierno LM Larriestra A J. Dairy Herd Mastitis Program in Argentina: Farm Clusters and Effects on Bulk Milk Somatic Cell Counts. Pakistan Veterinary Journal. 2013: 0253; 2074-7764.
- 319- von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect. Dis. 2002; 2: 677-685.
- 320- Vuong C, Götz F, Otto. Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun. 2000; 68: 1048-1053
- 321- Waage S, Mørk T, Røros A, Aasland D, Hunshamar A, Ødegaard SA. Bacteria Associated with Clinical Mastitis in Dairy Heifers. J. Dairy Sci. 1999; 82: 712-719.
- 322- Watts JL, Pankey JW, Nickerson SC. Evaluation of the Staph-ident and Staphase systems for identification of staphylococci from bovine intramammary infections. J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 448-452.
- 323- Watts J. Etiological agents of bovine mastitis. Vet. Microbiol. 1988; 16: 41-66.
- Watts JL, Owens WE. Synergistic hemolysis associated with coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mammary glands. J. Clin. Microbiol. 1987; 25: 2037-2039.

- 324- Watts JL, Owens WE. Synergistic hemolysis associated with coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mammary glands. J. Clin. Microbiol. 1987; 25: 2037-2039
- 325- Watts JL; Owens WE. Prevalence of *Staphylococcal* species in four dairy herds. Research in Veterinary. Sciencies. 1989; 46: 1-4.
- 326- Watts JL, Ray CH, Washburn PJ. A convenient method for differentiation of coagulase-negative Staphylococci isolated from bovine mammary glands. J. Dairy Sci. 1991; 74: 426-428
- 327- Watts JL, Yancey RJ. Identification of veterinary pathogens by use of commercial identification systems and new trends in antimicrobial susceptibility testing of veterinary pathogens. Clin. Microbiol. Rev. 1994; 7: 346-356.
- 328- Watts JL, Salmon SA, Yancey RS, Nickerson SC, Weaver LJ, Hoemberg C, Pankey JW, Fox LK. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. J. Dairy Sci. 1995; 78: 1637-1648.
- 319- White DG, Harmon RJ, Matos JES, Langlois BE. Isolation and identification of coagulase negative *Staphylococcus* species from bovine body sites and streak canals of nulliparous heifers. J. Dairy Sci. 1989; 72: 1886-1892.
- 330- Wilkinson BJ. Staphylococcal capsules and slime. En: Easmon C.S.F.; Adlam, C.(eds). *Staphylococci and Staphylococcal infections*. Vol. 2. The Organism *In Vivo* and *In Vitro*. Academic Press.1983.
- 331- Wilson DJ, Gonzalez RN, Case KL, Garrison LL, Grohn YT. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. J. Dairy Sci. 1999; 82: 1664-1670.

- 332- Winslow CEA, Winslow AR. The sistematic relationships of the Coccaceae. John Wiley, Nueva York. 1908.
- 333- Winslow CEA, Rothberg N, Parsons EL. Notes and the classification of the white and orange staphylococci. J. Bacteriol. 1920; 5: 145-168.
- 334- Wolter W, Kloppert B. Interpretación de los resultados del conteo celular y de la aplicación de la terapia. Avances en el Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina. Guadalajara, Jalisco, México. 2004; 5.
- 335- World Health Organization. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. WHO/CDS/CSR/DRS/20012 [Online] <http://www.who.int/csr/resources/publication/drugresist>
- 336- Zadoks R, van Leeuwen W, Barkema H, Sampimon O, Verbrugh H, Schukken YH, van Belkum A. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 1931-1939.
- 337- Zadoks RN, van Leeuwen WB. Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, Belkum A. Comparision of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 3894-3902.
- 338- Zadoks RN. Species identification of CNS: Genotyping as the Gold standard. In proceedings: Heifer mastitis conference Ghent, Belgium. 2007: 25-26.
- 339- Zadoks RN, Watts JL. Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. Vet. Microbiol. 2009; 134: 20-28.

- 340- Zhang S, Maddox C. Cytotoxic Activity of Coagulase-Negative Staphylococci in Bovine Mastitis. *Infect. Immun.* 2000; 68: 1102-1108.
- 341- Zhang Y, Agidi S, LeJeune JT. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. *J. Appl. Microbiol.* 2009; 107: 1375-1383.
- 342- Ziebuhr W, Heilmann C, Gotz F, Meyer P, Wilms K, Straube B, Hacker J. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.* 1997; 65: 890-896.
- 343- Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kranzler H, Batzilla C, Kozitskaya S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: How a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006; 28: S14-20.
- 344- Zinsser "Microbiología" 20ª ed. Editorial médica Panamericana. 1994; 23: 554-575.